Aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg
Lehrstuhl: Prof. Dr. T. H. SCHIEBLER

DIE HYDROLASEN DES DÜNNDARMEPITHELS BEIM MEERSCHWEINCHEN WÄHREND DER PRÄNATALEN ENTWICKLUNG *

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ernst STRAUSS
aus Bad Windsheim/Mfr.

Würzburg, den 16. 01. 1981

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 105)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Würzburg
Lehrstuhl: Prof. Dr. T. H. SCHIEBLER

DIE HYDROLASEN DES DÜNNDARMEPITHELS BEIM MEERSCHWEINCHEN WÄHREND DER PRÄNATALEN ENTWICKLUNG *

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Ernst STRAUSS
aus Bad Windsheim/Mfr.

Würzburg, den 16. 01. 1981

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 105)

Referent: Prof. Dr. med. R. GOSSRAU

Korreferent: Prof. Dr. med. T. H. SCHIEBLER

Dekan: Prof. Dr. med. K.-H. WULF

Tag der mündlichen Prüfung: 20.2.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Meiner Familie und meinen Eltern gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543519_0151

INHALT Seite

EINLEITUNG 1

MATERIAL UND METHODEN 3

Bestimmung des Embryonalalters 4

Gewebevorbehandlung 5

Semidünnschnitt-Lichtmikroskopie 5

Histochemie 5

Biochemie 6

Färberische Lichtmikroskopie 6

Semidünnschnitt-Lichtmikroskopie 7

Histochemie 7

Biochemie 9

BEFUNDE 12

Färberische und Semidünnschnitt-Lichtmikroskopie 13

Histochemie 16

Mikrovilläre Hydrolasen 16

Lysosomale Hydrolasen 21

Biochemie 26

Kinetische Untersuchungen 26

Mikrovilläre Hydrolasen 26

Lysosomale Hydrolasen 27

Angewandte Untersuchungen 28

Mikrovilläre Hydrolasen 28

Lysosomale Hydrolasen 31

DISKUSSION 35

Biochemische und histochemische Methoden 36

Seite

Differenzierungsphasen des pränatalen Darmepithels 42

Vergleich der Entwicklung des Dünndarm- und Gallenblasenepithels 52

ZUSAMMENFASSUNG 56

LITERATUR 59

TABELLEN 68

ABBILDUNGEN 70

EINLEITUNG

Licht- und elektronenmikroskopische sowie histochemische und biochemische Untersuchungen am postnatalen Dünndarm vom Meerschweinchen (MERRILL et al. 1967, WILLIAMS und BECK 1969, GOSSRAU 1975 a, HAVRÁNKOVÁ und LOJDA 1977, HARTMANN und GOSSRAU 1978) haben gezeigt, daß die Entwicklung des Darmepithels z. Zt. der Geburt weitgehend abgeschlossen ist. Von den Enzymen, die bisher während der Postnatalentwicklung bearbeitet wurden, haben sich die Membran- und Lysosomenhydrolasen als besonders wichtig herausgestellt, weil sie vergleichsweise massive Veränderungen durchmachen und Informationen über spezifische Leistungen des Darmepithels liefern (HARTMANN und GOSSRAU 1978, vgl. GOSSRAU 1975 b: Ratte, Maus).

Einzelheiten über die Entwicklung der Membran- und Lysosomenhydrolasen im Dünndarmepithel der Pränatalzeit sind erst für wenige Enzyme, Dünndarmabschnitte und Epithelzelltypen bekannt. Histochemisch haben WILLIAMS und BECK (1969) für die saure Phosphatase und ß-D-Glucuronidase in den Lysosomen der Ileumenterocyten der letzten Pränataltage, ANDERSON und LEISSRING (1961), GOSSRAU (1975 c) sowie HAVRÁNKOVÁ und LOJDA (1977) ab dem 30. Embryonaltag für die Membranenzyme alkalische Phosphatase, Aminopeptidase M und Disaccharidasen der Epithelzellen von Duodenum, Jejunum und Ileum vor allem Aktivitätsanstiege gefunden. Es fehlen biochemische Daten zum Aktivitätsverlauf der Membran- und Lysosomenhydrolasen und histochemische Angaben über die bereits nachgewiesenen und weitere Hydrolasen im Epithel aller Dünndarmabschnitte der gesamten Pränatalzeit (vgl. STRAUSS und GOSSRAU 1980).

Auf die gleichzeitig ablaufende morphologische Differenzierung, z. B. die Umwandlung des mehrschichtigen zum einschichtigen Epithel oder die Villogenese (vgl. ALOISI 1932) bzw. auf die Bedeutung der enzymhistochemischen und -biochemischen Veränderungen für diese Vorgänge wurde bisher ebenfalls kaum oder nicht eingegangen.

Hier setzt die vorliegende Untersuchung ein. Im Mittelpunkt stehen die membrangebundenen und lysosomalen Glykosidasen und Proteasen sowie einige unspezifische Phosphatasen und Esterasen im Epithel und seinen Zelltypen und z. T. des Stromas von Jejunum und Ileum zwischen dem 22. Embryonaltag und der Geburt. Zur Erfassung geringer Umsatzraten und um genaue Angaben über den Aktivitätsverlauf zu erhalten, wurden die Glykosidasen und Phosphatasen nicht nur mit histochemischen Methoden lokalisiert sondern auch biochemisch-fluorometrisch mit den hochempfindlichen, für Darmstudien aber noch nicht breit eingesetzten oder geprüften (vgl. BRETT et al. 1973, DE BOTH und PLAISIER 1974, GOSSRAU 1977 a) Methylumbelliferylsubstraten (LEABECK 1975) quantifiziert; die restlichen Hydrolasen haben wir mit z. T. optimierten oder neuen Verfahren histochemisch dargestellt (LOJDA et al. 1979).

Auskunft über die Ausreifung der mikrovillären und lysosomalen Hydrolasen liefert unsere Studie dadurch, daß wir die Glykosidasen und Phosphatasen biochemisch auch postpartal untersucht haben. Über die mikrovillären Hydrolasen während der Postnatalzeit liegen bereits Angaben vor (HARTMANN und GOSSRAU 1978); jedoch wurden die Enzymaktivitäten mit Naphthylsubstraten gemessen, deren kinetische und meßtechnische

Eigenschaften von denen der Methylumbelliferylsubstrate abweichen, wodurch die Ergebnisse nicht ohne weiteres vergleichbar sind. Für die lysosomalen Glykosidasen und Phosphatasen existieren postnatal unseres Wissens noch keine zusammenhängenden biochemischen Daten; histochemisch wurden diese Enzyme detailliert von HARTMANN und GOSSRAU (1978) bearbeitet. Um Aussagen über die funktionelle Bedeutung der Membran- und Lysosomenhydrolasen des pränatalen Dünndarmepithels und partiell des Stromas machen zu können, haben wir neben den enzymatischen zusätzlich die morphologischen Veränderungen während dieser Entwicklungsphase untersucht.

MATERIAL UND METHODEN

Für die prä- und postnatalen Darmstudien wurden 113 Meerschweinchen verwendet. Pränatal haben wir mit histologischen, histochemischen und biochemischen, postnatal nur mit biochemischen Methoden gearbeitet. Für die histologischen und histochemischen Studien wurden die Embryonen von 45 Muttertieren (durchschnittlich 3-4 Embryonen pro Muttertier), für die biochemischen die Embryonen von 43 Muttertieren und zusätzlich 25 Meerschweinchen zwischen dem 1. Lebenstag (LT) und 2 Jahren benutzt. Histologisch und histochemisch haben wir den Dünndarm ab dem 16. Embryonaltag (ET), biochemisch ab dem 28. ET untersucht (LW Lebenswoche; LM Lebensmonat).

Der Dünndarm aller Embryonen eines Muttertieres wurde gemeinsam verarbeitet und zu 1 ET zusammengefaßt.

Die Meerschweinchen stammten aus eigener Zucht, wurden bei künstlichem 12-stündigem Licht-Dunkel-Wechsel und einer Stalltemperatur von 22±2°C gehalten und erhielten Altromin®-Haltungsfutter, Heu und Leitungswasser ad libitum. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation in Äthernarkose für die histochemischen Untersuchungen zwischen 9.00 und 10.00, für die biochemischen zwischen 18.00 und 21.00. Für die pränatalen Untersuchungen wurden die Uterushörner der Muttertiere eröffnet und den Embryonen bis zum 42. ET der Dünndarm in toto, danach Jejunum und Ileum einzeln, für die postnatalen Studien wurden Jejunum und Ileum immer getrennt entnommen.

Die Bestimmung des Embryonalalters erfolgte mit 3 Methoden. Tastbefund. Im Gegensatz zum üblichen Vorgehen, bei denen das schwangere Muttertier in Rückenlage in die eine Hand genommen und mit der anderen Hand von oben das Abdomen getastet wird (KAUFMANN und DAVIDOFF 1977, Lit.), hat es sich als zweckmäßig herausgestellt die schwangeren Muttertiere auf eine Unterlage zu setzen bzw. sie in ihrer natürlichen Stellung zu belassen. Dann ist es möglich von lateral und ventral das Abdomen des Meerschweinchens zu palpieren und die Frucht zwischen dem Daumen einerseits und dem Zeigefinger sowie Mittelfinger andererseits zu tasten. Vorteilhaft ist dabei, daß die Meerschweinchen weniger ängstlich reagieren und die Bauchdecken völlig entspannt sind. Mit dieser Methode kann das Embryonalalter auf ca. ± 8 Schwangerschaftstage genau angegeben werden. Ermittlung mit Diagramm. Hier korreliert die Scheitel-Steiß-Länge (SSL) der Embryonen direkt mit dem Alter (KAUFMANN 1969). Dazu wurde bei den ein-

zelnen Embryonen eines Wurfes die SSL gemessen und der Mittelwert errechnet, der zur Bestimmung des Embryonalalters diente. Meistens wurde diese Methode benutzt. Letzter Wurftermin der Muttertiere. Ca. 6 h nach der Geburt können Meerschweinchen erneut konzipieren (JUNG 1962).

Die Kombination der 2. und 3. Methode läßt mit großer Sicherheit eine genaue Aussage über das tatsächliche Alter der Embryonen zu; der Tastbefund diente zur groben Orientierung über das ungefähre Schwangerschaftsalter.

G e w e b e v o r b e h a n d l u n g

Semidünnschnitt-Lichtmikroskopie (vgl. GEYER 1973). Immersionsfixation etwa 1 mm^3 großer Dünndarmstücke in 1% OsO_4 in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4 für ca. 3 h bei 4°C gefolgt von Spülen in 0,1 M Phosphat-Puffer, pH 7,4 für 15 min bei 4°C; Dehydrierung mit 50%, 70%, 80% und 96% Äthanol und Einbettung über Propylenoxid in Durcupan® (Fluka).

Histochemie (vgl. LOJDA et al. 1976, 1979). Aufblocken nativer Dünndarmstücke auf angefeuchtete Kryostattische, Umwickeln von Organstücken und Kryostattischen mit Plastikfolie und Einfrieren in N_2-gekühltem Propan. Herstellen von Kryostatschnitten (10 µm; Schneidetemperatur -25°C bis -30°C, System Dittes-Duspiva, Modell 808 T), Montage auf zimmerwarme Objektträger und sammeln in Küvetten im Kryostaten oder sammeln der unmontierten Schnitte in Messingkästen und Gefriertrocknung mit einer Leybold-Heraeus-Anlage (GT 001) und

einer Edwards-Vakuumpumpe (EDM 12) und anschließend Montage mit 1% Celloidin auf zimmerwarme, albuminisierte und ungeflammte Objektträger, oder vor dem Aufblocken Immersionsfixation der Dünndarmstücke in 4% Formaldehyd mit 1% $CaCl_2$ (pH 7,5, Einstellung mit NaOH) gefolgt von Spülen in Holtscher-Lösung für jeweils 24 h bei $4^{o}C$; die Montage der Schnitte von fixiertem Material erfolgte auf albuminisierte und geflammte Objektträger.

Biochemie (vgl. HARTMANN und GOSSRAU 1978). Pränataler Darm wurde uneröffnet und ab dem 42. ET gesondert als Jejunum und Ileum, postnataler Darm eröffnet und gesäubert und immer getrennt als Jejunum und Ileum aufgeblockt und in flüssigem N_2 eingefroren. Herstellung von Kryostatschnitten (40 µm, System Dittes-Duspiva, Modell 808 T), sammeln in Messingkästen und Gefriertrocknung in Leybold-Heraeus-Anlage (s. o.) bei $-50^{o}C$ und 0,01 Torr über Nacht. Herstellung der Homogenate für die angewandten Untersuchungen sofort, für die methodischen nach Aufbewahrung der gefriergetrockneten Schnitte in Petrischalen bei Zimmertemperatur für maximal 48 h; hierzu wurden zu 100 mg Trockendarm 3 ml $4^{o}C$ kaltes A. dest. pipettiert und mit einem Potter S Homogenisator mit Teflonkolben mit 1000 U/min und 20 Hüben für 3 min homogenisiert.

F ä r b e r i s c h e L i c h t m i k r o s k o p i e

Hämalaun-Eosin nach ROMEIS (1968; § 703) und Methylenblau nach SPANNHOF (1967).

Semidünnschnitt-Lichtmikroskopie

Herstellung der Schnitte (Schnittdicke 1-2 µm) mit einem Porter-Blum-Mikrotom; Strecken und Montage der Schnitte mit A. dest. auf warmem Strecktisch, Färben mit 1% Methylenblau in 1% Borax 1:1 gemischt mit 1% Azur II (sämtlich wässrige Lösungen) unter Erwärmen der Objektträger über Bunsenbrennerflamme bis zur Dampfentwicklung; danach abgießen der Färbelösung, spülen in A. dest., Lufttrocknung und Eindecken in Entellan®.

Histochemie

Bürstensaumhydrolasen (s. auch LOJDA et al. 1976, 1979. Untersuchung an frischen und an Schnitten von formaldehyd-fixiertem Darm sowie an gefriergetrockneten und celloidin-montierten Schnitten). Alkalische Phosphatase mit Naphthol-AS-TR-phosphat (Nutritional Company) als Substrat und Fast Blue B (FBB) zur Simultankupplung modifiziert nach BURSTONE sowie mit 1-Naphthylphosphat (Merck) als Substrat und dem gleichen Simultankuppler modifiziert nach PEARSE; Lactase mit 5-Br-4-Cl-3-Indolyl-ß-D-fucosid (Bachem) und mit 1-Naphthyl-ß-D-glucosid (Koch-Light, Senn) als Substraten nach LOJDA und KRAML bzw. nach GOSSRAU, α-D-Glucosidasen nach GOSSRAU und Aminopeptidase M-Methode mit Leu-4-methoxy-2-naphthylamid (Leu-MNA, Bachem) sowie Ala-MNA und Ala-2-naphthylamid (Ala-2NA, Bachem) als Substraten und hexazotiertem Pararosanilin (HPR) oder Neufuchsin (HNF) zur Simultankupplung nach LOJDA sowie mit den gleichen Substraten modifiziert nach

NACHLAS et al., γ-Glutamyltransferase mit γ-Glu-2NA (Bachem) als Substrat nach LOJDA mit HPR als Simultankuppler sowie modifiziert nach ROSENBLATT et al. mit γ-Glu-MNA (Bachem) ohne Gly-Gly als Aktivator und Dipeptidylpeptidase IV-Methode (DPP IV) mit Gly-Pro-MNA (Bachem) nach LOJDA und GOSSRAU; außerdem Untersuchung der Membranpeptidasen mit der DPP IV-Methode aber mit äquimolarem Ala-Phe-Pro-MNA (Bachem) und Pro-Arg-MNA (Bachem) an Stelle von Gly-Pro-MNA als Substraten. Die Abkürzungen der Aminosäuren entsprechen denen der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (Europ. J. Biochem. 27, 201-207, 1972); bei allen Aminosäuren handelt es sich um die L-Form.

Lysosomale Hydrolasen (s. auch LOJDA et al. 1976, 1979. Untersuchung an Schnitten von formaldehyd-fixiertem Material). ß-D-N-Acetylglucosaminidase mit Naphthol-AS-BI-ß-D-N-acetylglucosaminid (Senn) modifiziert nach HAYASHI, ß-D-Glucuronidase mit Naphthol-AS-BI-ß-D-glucuronid (Koch-Light) modifiziert nach HAYASHI et al., saure ß-D-Galactosidase mit 5-Br-4-Cl-3-Indolyl-ß-D-galactosid (Bachem) und der Indigogenmethode nach LOJDA und der Azoindoxylmethode nach GOSSRAU, α-D-Mannosidase mit 1-Naphthyl-α-D-mannosid (Koch-Light) nach GOSSRAU, α-D-Galactosidase mit 1-Napthyl-α-D-galactosid (Koch-Light) nach GOSSRAU, saure Phosphatase mit Naphthol-AS-TR-phosphat nach LOJDA und Dipeptidylpeptidase II-Methode mit Lys-Ala-MNA (Bachem) nach GOSSRAU und LOJDA sowie die unspezifischen Esterasen mit Naphthol-AS-acetat, Naphthol-AS-D-acetat, Naphthol-AS-D-chlor-acetat und Naphthol-AS-TR-acetat (alle Serva) nach LOJDA und FRIĆ, mit Indoxylacetat, 5-Br-3-Indoxylacetat und 5-Br-4-Cl-3-Indoxyl-

acetat (Bachem, Serva) modifiziert nach DELELLIS und FISHMAN und mit 1-Naphthylacetat (Serva) modifiziert nach DAVIS und ORNSTEIN.

Inkubation bei 37°C in wasserdampfgesättigten Plexiglaskammern; Inkubationszeiten für alkalische Phosphatase 5 und 20 min, Aminopeptidase M, Dipeptidylpeptidase IV, γ-Glutamyltransferase und andere Peptidasen 40 min, α-D-Glucosidasen 60 min, Lactase 60 und 80 min, lysosomale Hydrolasen 60 min, unspezifische Esterasen mit 1-Naphthylacetat 5 min, mit den restlichen Substraten 30 min.

Nach der Inkubation Spülen der Schnitte in Leitungswasser, z. T. über Nacht Einstellen in A. dest. und Eindecken in Glycerin-Gelatine, Karion F® (Peptidasennachweise mit HPR zur Simultankupplung) oder nach Dehydrierung in Entellan® (unspezifische Esterase mit 1-Naphthylacetat als Substrat). Bei den Peptidasennachweisen mit FFB zur Simultankupplung wurden die Schnitte in A. dest. gespült, 5 min bei Zimmertemperatur mit 2% wasserfreien $CuSO_4$ behandelt, erneut in A. dest. gespült und in Glycerin-Gelatine eingedeckt. - Die Auswertung der Schnitte erfolgte sofort oder spätestens 24 h nach dem Eindecken.

B i o c h e m i e

25 µl Homogenat wurden zu 0,25 ml eiskalter Substrat-Puffer-Lösung (Lösung von 1 mg Substrat in 50 µl Dimethylformamid) in Pyrexröhrchen (Corning) pipettiert.

Methodische Untersuchungen (s. auch HARTMANN und GOSSRAU 1978). Mit den 1-Naphthyl- und 4-Methylumbelliferylsubstraten wurden für die mikrovillären und lysosomalen Hydrolasen die Abhängigkeit der Enzymaktivität von Substratkonzentration (0,0468-12 mM), pH (3-11) und Inkubationszeit (1-60 min) und graphisch und rechnerisch (vgl. HARTMANN und GOSSRAU 1978) nach LINEWEAVER und BURK (1934) und elektronischem Rechner TI Programmable 59 mit Drucker PC-100 A (Texas Instruments) die Michaeliskonstanten (K_m) und relativen maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) zur Ermittlung optimaler Ansätze bestimmt. 1-Naphthyl(1N)verbindungen waren 1N-ß-D-galactosid (Koch-Light), 1N-ß-D-acetylglucosaminid (Serva), 1N-α-D-mannosid (Koch-Light), 1N-α-D-galactosid (Koch-Light) in 0,1 M Citronensäure-Phosphat-Puffer und 1N-ß-D-glucuronid (Koch-Light) sowie 1N-phosphat (Merck) in 0,1 M Acetat- bzw. Tris-HCl-Puffer, die verwendeten 4-Methylumbelliferylsubstrate sind unten aufgeführt. Mit 0,4 mM Gluconolacton (Schuchardt) und 0,4 mM Galactonolacton (Roth) und Methylumbelliferyl-ß-D-glucosid und -fucosid (s. u.) wurde zusätzlich die Inhibitorkonstante (K_i; vgl. BERGMEYER 1977, BISSWANGER 1979) und 1 mM Gluconolacton, Galactonolacton und p-Chlormercuribenzoat (Na-salz, pCMB; Roth) sowie 2,7 mM Lactose (Serva) die Hemmrate der Hydrolyse von Methylumbelliferyl-ß-D-glucosid und -cellobiosid bestimmt.

Angewandte Untersuchungen. Bürstensaumhydrolasen. Alkalische Phosphatase mit 0,375 mM 4-Methylumbelliferyl(MU)phosphat (Koch-Light) in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 9,5, α-D-Glucosidasen mit 0,375 mM 4-MU-α-D-glucosid (Koch-Light) in 0,1 M Citronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,5, ß-D-Glycosidasen mit

0,375 mM 4-MU-ß-D-glucosid (Koch-Light), 1,5 mM 4-MU-ß-D-cellobiosid (Koch-Light) und 0,75 mM 4-MU-ß-D-galactosid (Serva) in 0,1 M Citronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,0, Lactase-ß-D-Glucosidase mit 0,375 mM 4-MU-ß-D-fucosid (Koch-Light) in 0,1 M Citronensäure-Phosphat-Puffer, pH 6,0.

Lysosomale Hydrolasen. Saure ß-D-Galactosidase mit 0,375 mM 4-MU-ß-D-galactosid (Serva) in 0,1 M Citronensäure-Phosphat-Puffer, pH 4,0, ß-D-N-Acetylglucosaminidase mit 0,375 mM 4-MU-ß-D-N-acetylglucosaminid (Koch-Light) in 0,1 M Citronensäure-Phosphat-Puffer, pH 5,0, α-D-Mannosidase mit 1,5 mM 4-MU-α-D-mannosid (Koch-Light) in 0,1 M Citronensäure-Phosphat-Puffer, pH 4,0, α-D-Galactosidase mit 6,0 mM 4-MU-α-D-galactosid (Koch-Light) in 0,1 M Citronensäure-Phosphat-Puffer, pH 5,0, ß-D-glucuronidase mit 0,375 mM 4-MU-ß-D-glucuronid (Koch-Light) in 0,1 M Acetat-Puffer, pH 4,5, saure Phosphatase mit 0,375 mM 4-MU-phosphat (Koch-Light) in 0,1 M Acetat-Puffer, pH 5,5. - Kontrollen. Homogenat mit A. dest. an Stelle der Substratlösung und Substratlösung mit A. dest. statt des Homogenates.

Inkubation im Wasserbad (Köttermann, Memmert, Colora) bei 37°C; die Inkubationszeiten (angewandte Messungen) betrugen für die alkalische und saure Phosphatase sowie ß-D-N-Acetylglucosaminidase 5 min, für die anderen Hydrolasen 20 min. Beendigung der Inkubation durch Einstellen der Röhrchen in Eisbad und Alkalisierung der Proben und Kontrollen mit 1,5 ml 0,5 M Natrium-Bicarbonat-Puffer oder 0,25 N NaOH. Danach wurden die Röhrchen für 1 min-10 h bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend die Reaktionsprodukte 1-Naphthol

(Primärfilter 363 nm, Sekundärfilter 450 nm) und Methylumbelliferon (Primärfilter 350 nm, Sekundärfilter 450 nm, Schott oder Colora) mit einem Farrand-Ratio-Fluorometer gemessen, das vor und während jeder Messung mit einem Quininsulfat-Standard geeicht wurde. Für Routinezwecke wurden 1-Naphthol und Methylumbelliferon mit Natrium-Bicarbonat-Puffer behandelt und 20 min nach der Alkalisierung gemessen. Angabe der Aktivität in Fluoreszenzeinheiten (FE) und bei Verwendung der Methylumbelliferylsubstrate zusätzlich in µ Molen umgesetztes Substrat/min. Zur Umrechnung wurde mit Methylumbelliferon (Koch-Light; Lösung von 1 mg MU/0,5 ml Dimethylformamid; Herstellung über Verdünnungsreihe) eine Eichkurve erstellt. Alle Aktivitäten sind die Mittelwerte aus 2 Einzelmessungen pro Tier an mindestens 3 verschiedenen Meerschweinchen. Die Abweichungen vom Mittelwert der Aktivitäten für den gleichen Embryonaltag oder Lebenstag betrugen nicht mehr als 10%; lediglich bei den Messungen mit Methylumbelliferylphosphat im alkalischen und sauren Bereich lagen die Schwankungen darüber.

BEFUNDE

Die im folgenden für die einzelnen ET geschilderten morphologischen und histochemischen Befunde entsprechen den jeweils wichtigsten Ereignissen; andere z. T. früher oder später auftretende Entwicklungsstadien können ebenfalls vorkommen, so daß fließende Übergänge bzw. Überlappungen existieren; z. B. beobachtet man am 35. ET unabhängig vom Dünn-

darmabschnitt neben den dann dominierenden Sekundärzotten noch Löcher und Spalten im mehrreihigen Epithel, in dieses einsprossendes Mesenchym, Primärzotten oder bereits zerfallende Zottenspitzen und die dazugehörenden Hydrolasenverteilungsmuster und -aktivitäten.

Färberische und Semidünnschnitt-Lichtmikroskopie

Darmquerschnitte sind erstmalig am 22. ET (Abb. 1) zu erkennen. Die Darmwand besteht überall innen aus einem relativ dicht strukturierten mehrschichtigen oder mehrreihigen Epithel, an das außen locker angeordnetes Mesenchym grenzt; vor allem oberhalb der Basalmembran und in geringer Zahl diffus verstreut kommen im Epithel basophile Granula vor. Epithel- und Mesenchymzellen sind cytoplasmaarm. Das Darmlumen ist spaltförmig. Am 26. ET kann zwischen Jejunum und Ileum unterschieden werden. Im Jejunum ist das Epithel gegenüber früher dicker geworden, das Darmlumen kaum oder nicht zu erkennen; im Ileum hat sich nichts geändert. In beiden Dünndarmabschnitten hat sich das Mesenchym außen zur Muscularis umgewandelt, innen nicht; die Darmwand ist dreischichtig geworden und besteht aus einer inneren Epithel-, einer mittleren Mesenchym- und einer äußeren Muskelschicht.

Am 28. und vor allem 29. ET wachsen im Jejunum an einigen Stellen Mesenchymzellen der mittleren Schicht fingerförmig ins Epithel ein; gleichzeitig treten intraepithelial Löcher und mit dem Darmlumen kommunizierende Spalten auf. Pilz-

förmige Primärzotten sind im Jejunum am 30. ET zu erkennen. Ihr oberer Abschnitt ist reich an erythrozytenhaltigen Kapillaren und Mesenchym und rundlich aufgetrieben; der untere schlank und mesenchymarm. Die Zellen des mehrschichtigen oder mehrreihigen Epithels sind überwiegend regellos geformt; das Cytoplasmavolumen hat gegenüber vorher zugenommen; hochprismatisch sind nur die an das Zottenstroma grenzenden Epithelzellen. Das Ileum hat noch keine Primärzotten ausgebildet; sie treten hier erst nach dem 30. ET auf. Am 35. ET (Abb. 2) hat der Durchmesser des Darmlumens zugenommen; die Darmwand ist relativ dünner geworden, die Zottenzahl angestiegen. Die Zotten selbst haben sich vor allem im Jejunum und im geringeren Maße im Ileum zu Sekundärzotten umgewandelt; sie sind länger als die Primärzotten, verfügen ausschließlich über ein einschichtiges Epithel und liegen dicht aneinandergedrängt; das Darmlumen erscheint verschlossen. Im oberen und mittleren Zottendrittel haben die Epithelzellen ein wasserhelles kaum oder nicht strukturiertes, im unteren ein leicht basophiles z. T. vakuolisiertes Cytoplasma. Das obere und mittlere Drittel der frühen Sekundärzotten ist durch weitgestellte, mit zahlreichen Erythrozyten gefüllte Kapillaren im Zottenstroma ballonförmig aufgetrieben; Stromazellen sind spärlich vertreten. Die Kernplasmarelation der Epithelzellen beträgt ca. 1:4; dies entspricht etwa dem Wert der Enterocyten des erwachsenen Meerschweinchens. Die Kerne liegen direkt unterhalb des Bürstensaums im apikalen Plasma der Saumzellen; sie wirken "kantig" oder unregelmäßig geformt, sind verschieden stark angefärbt und enthalten teilweise stark basophile Chromatinverdichtungen oder mehrere Nucleolen. In der Folgezeit werden die Sekundärzot-

ten noch länger und schlanker; sonst finden sich keine Veränderungen.

Am 39. ET kommen die Kerne der Enterocyten im oberen und mittleren Zottendrittel im apikalen Cytoplasma, im unteren eher basal vor. Außerdem sind die Enterocytenkerne des unteren Zottendrittels z. T. größer als die im mittleren und oberen und füllen mitunter die Enterocyten fast völlig aus. Die Stromazellen sind zahlreicher geworden; die Kapillardurchmesser haben sich verringert.

Am 40. ET sieht man im Zottenepithel vereinzelt Enterocyten mit blassem Cytoplasma; sie heben sich deutlich von den übrigen kräftig blau gefärbten ab. Ihr Kern enthält basophile Chromatinbrocken, ist längsoval geformt und füllt fast die gesamte Zelle aus. Außer kaum tingierten Enterocyten im oberen und mittleren Zottendrittel sind auch die im unteren schwach gefärbt. Im Stroma finden sich neben den bisher vorhandenen Mesenchym- und Endothelzellen der Kapillaren glatte Muskelzellen, Monozyten und verschiedene Typen von Granulozyten. Am 42., 46., 49. und 50. ET fallen die dicht aneinanderliegenden und sich berührenden langen Zotten, das kaum erkennbare Darmlumen und die relativ kleinen Kerne der Enterocyten des unteren Zottendrittels auf; lumennahe Zottenabschnitte gehen ab dem 48. ET unter (Abb. 3).

Am 51. ET sind die Kerne der Enterocyten überall in den Zotten gelappt. Im apikalen Cytoplasma kommen kräftig dunkelblau gefärbte Granula vor. Zwischen den Enterocyten sind einige Becherzellen, endokrine Zellen und Lymphozyten mit run-

dem basophilen Kern und spärlichem ringförmigen Cytoplasma zu beobachten. Erstmalig kommen vereinzelt Krypten vor. Im Stroma ist eine Lamina muscularis mucosae zu erkennen. Am 53. ET hat die Zahl der Krypten beträchtlich, die der Becherzellen, endokrinen Zellen und Lymphocyten kaum zugenommen. Die Enterocytenkerne sind eher rund, wenig gelappt und liegen oft im basalen Cytoplasma; im Cytoplasma selbst sieht man außer den bisher unmittelbar unter dem apikalen Plasmalemm gelegenen dicht gepackten kleinen und stark basophilen Granula größere ubiquitär verstreute Vakuolen (Abb. 4). In der Zeit zwischen dem 56. ET und der Geburt (um den 63. ET) werden vor allem die Zotten länger und schlanker; zerfallende Zottenspitzen sind nicht mehr zu beobachten.

H i s t o c h e m i e

M i k r o v i l l ä r e H y d r o l a s e n

A l k a l i s c h e P h o s p h a t a s e

Unabhängig von der Gewebevorbehandlung sieht man die alkalische Phosphatase (aP) am 22. ET (Abb. 5) schwach aktiv und mit etwas höherer Aktivität zwischen dem 26. und 30. ET (Abb. 6). Verglichen mit frischen Kryostatschnitten ist der Azofarbstoff nach Formaldehydfixation präziser lokalisiert; 1-Naphthylphosphat wird schneller umgesetzt als das Naphthol-AS-TR-Substrat bzw. liefert mehr Reaktionsprodukt. Der Azofarbstoff ist an das apikale Plasmalemm der luminalen und/oder intraepithelial an das von Epithelzellen gebunden, die an Löcher grenzen. Daneben existieren im Jejunum und Ileum

Abschnitte ohne Aktivität. Ab dem 35. ET (Abb. 7) steigt die aP-Aktivität weiter an; Jejunum und Ileum verhalten sich gleich. Im Epithel ist das Enzym auf die Mikrovillizone beschränkt. Im Stroma reagieren Bindegewebsfasern, Kapillarendothelien und in den Kapillaren neutrophile Granulozyten. Die Bindegewebsreaktion fällt in verschiedenen Stromabereichen unterschiedlich aus, wobei negative neben positiven Anteilen vorkommen können. Am 37. ET ist die Mikrovillizone im Jejunum etwa doppelt so aktiv wie im Ileum, das Stroma beider Darmabschnitte zeigt keine auffälligen Unterschiede. Zwischen dem 39. ET und der Geburt bleibt die Aktivität der aP im Bürstensaum des Jejunum unverändert; die im Ileum steigt an und erreicht bis zum 41. ET etwa die des Jejunum. Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Zotten sind entweder nicht klar zu erkennen, oder die aP dominiert im unteren Zottendrittel. Die Stromareaktion der aP ist überwiegend am 42. ET (Abb. 8) mit Ausnahme der in den neutrophilen Granulozyten verschwunden. Das apikale Plasmalemm der Kryptenepithelien reagiert ab dem 33. ET positiv.

L a c t a s e - ß - D - G l u c o s i d a s e

Die Lactase (Lac) tritt erstmalig am 48. ET im Jejunum auf, wenn das Enzym an nativen Kryottetschnitten mit dem Indigogen- oder Azofarbstoffverfahren und 5-Br-4-Cl-3-Indoxyl-ß-D-Fucosid als Substrat nachgewiesen wird. Die Indigogenmethode lokalisiert weniger präzis als das Azofarbstoffverfahren. Der Azofarbstoff kommt in den Mikrovilli einiger Enterocytengruppen vor, die regellos in den Zotten auftreten; die meisten Saumzellen reagieren noch nicht. Am 56. ET ist die

Farbstoffmenge gegenüber vorher etwas angestiegen und findet sich überall im Bürstensaum des Zottenepithels und sämtlicher Villi. Zusätzlich ist etwas braunes Reaktionsprodukt mit 1-Naphthyl-ß-D-glucosid (Azomethode) als Substrat zu erkennen. Am 60. ET (Abb. 9) kann die Lac auch in Schnitten von formaldehyd-fixiertem Material dargestellt werden; die Lokalisation des Reaktionsproduktes ist nach Aldehydfixation mit allen 3 Methoden präziser als in nativen Kryostatschnitten, die Umsatzrate der Lac ist geringer. Mit frischen Schnitten hat die Farbstoffmenge gegenüber früher zugenommen.

α - D - G l u c o s i d a s e n

Erstmalig sind die α-D-Glucosidasen (α-Gluc) am 39. ET nachweisbar. In Schnitten von formaldehyd-fixierten Darmstücken entsteht etwas weniger und nur in der Mikrovillizone lokalisierter Azofarbstoff verglichen mit Schnitten von nativem Material, in denen Farbstoff zusätzlich im apikalen Enterocytencytoplasma erscheint. Der Azofarbstoff kommt nur im Zottenepithel und im Jejunum in größerer Menge als im Ileum vor. Später nimmt die Aktivität der α-Gluc bevorzugt im Ileum zu. Die Lokalisation des Farbstoffs hängt dann vom untersuchten ET und von der Gewebevorbehandlung ab; nach Formaldehydfixation ist er ab 41. ET (Abb. 10), mit nativen Schnitten zum Zeitpunkt der Geburt meist auf die Mikrovillizone beschränkt. Am Geburtstermin reagiert diese Zone auch in den Jejunum- und Ileumkrypten positiv.

P e p t i d a s e n

Der Nachweis mit der Aminopeptidase M-Methode (APM) wurde

mit Ala-2NA oder Leu-MNA an allen untersuchten, der der γ-Glutamyltranspeptidase (γ-GT) mit γ-Glu-2NA oder -MNA, mit der APM-Methode und Ala-MNA, der Dipeptidylpeptidase IV-Methode (DPP IV) und Gly-Pro-MNA, der DPP II-Methode und Lys-Ala-MNA und die Reaktion mit Ala-Phe-Pro- sowie Pro-Arg-MNA lediglich an manchen Embryonalstadien durchgeführt.

Am 29. ET wird nur Ala-2NA nach Stückfixation des Darms in Formaldehyd im apikalen Plasmalemm der luminalen Zellen des mehrschichtigen Epithels, von der Oberflächenmembran der Epithelzellen, die intraepithelialen Löchern anliegen und basal in stromanahen Epithelzellen umgesetzt. Am 30. ET reagieren mit dem gleichen Substrat auch native Kryostatschnitte an der Grenze zum Darmlumen und im Gebiet der intraepithelialen Löcher positiv; die Lokalisation des Azofarbstoffs ist weniger exakt als nach Fixation in Formaldehyd; die Farbstoffmenge ist in Schnitten von frischem Material am größten und hat gegenüber dem Vortag zugenommen. Am 35. ET kommt Reaktionsprodukt unabhängig von der Gewebevorbehandlung nur im Bürstensaum der Enterocyten des Zottenepithels vor. Außerdem fällt der Nachweis mit Leu-MNA positiv, aber schwächer als mit Ala-MNA aus. Ab dem 37. ET werden beide Naphthylamide etwa gleich schnell hydrolisiert; im Vergleich zu früher sind die Substratumsätze nach Fixation wesentlich niedriger als in nativen Kryostatschnitten. Ab 42. ET fallen die Nachweise weitgehend unabhängig von der Gewebevorbehandlung und stärker aus. Zwischen Jejunum und Ileum und den verschiedenen Zottenabschnitten bestehen keine eindeutigen Aktivitätsdifferenzen.

Die restlichen Peptidasennachweise erfolgten am 45., 54., 55., 62. und 63. ET. Außer Ala-MNA sowie γ-Glu-2NA und -MNA dienten Gly-Pro-, Lys-Ala-, Ala-Phe-Pro- und Pro-Arg-MNA als Substrate. Substratunabhängig sind die Umsätze in nativen Kryostatschnitten größer als in Schnitten von formaldehyd-fixiertem Material oder in gefriergetrockneten Schnitten nach Celloidinmontage. Mit hexazotiertem Neufuchsin oder hexazotiertem Pararosanilin ist die Lokalisation des Reaktionsproduktes in frischen Schnitten und nach Formaldehydfixation oder Gefriertrocknung, mit Fast Blue B nur in gefriergetrockneten celloidinmontierten Schnitten präzis; ähnlich verhält sich die Stabilität der Azofarbstoffe.

Am 45. ET wird Ala-MNA überall im Bürstensaum der Zotten schnell, Leu-MNA nur in der Mikrovillizone des unteren Zottendrittels langsam umgesetzt. Noch geringer sind die Farbstoffmengen in der gesamten Mikrovillizone der Zotten, wenn mit Gly-Pro-, Lys-Ala- oder Ala-Phe-Pro-MNA gearbeitet wird; die relativ höchste Hydrolyserate hat Gly-Pro-MNA. Pro-Arg- und γ-Glu-MNA oder -2NA werden bei pH 7 nicht sichtbar hydrolisiert. - Am 54. und 55. ET gleichen sich die Resultate. Gegenüber vorher entsteht mit Ala-, Leu-, Gly-Pro-, Lys-Ala- und Ala-Phe-Pro-MNA mehr, mit γ-Glu-2NA und -MNA sowie Pro-Arg-MNA erstmalig wenig Reaktionsprodukt. Ala- und Leu-MNA werden zusätzlich in der Mikrovillizone der Krypten, γ-Glu-MNA und -2NA eindeutig nur im oberen und mittleren Zottendrittel hydrolisiert. Maximale Hydrolyseraten findet man mit nahezu allen Substraten am 62. ET; die höchsten Umsätze liefert Ala-MNA gefolgt von Leu-, Gly-Pro-, Lys-Ala-, Ala-Phe-Pro- und Pro-Arg-MNA; lediglich γ-Glu-MNA und -2NA werden un-

verändert langsam gespalten. Mit Lys-Ala-MNA reagiert außerdem die DPP II in den Lysosomen der Enterocyten positiv. - Am 63. ET haben die Farbstoffmengen (Ausnahme: Gly-Pro-MNA) mit allen Substraten abgenommen. - Ala-MNA wird im Unterschied zu den übrigen Naphthylamiden am 62. und 63. ET auch von Zellen im Propriabindegewebe der Krypten umgesetzt.

Verglichen miteinander treten die aP und APM bereits im mehrschichtigen oder mehrreihigen Dünndarmepithel am 22. ET bzw. 29. ET auf und werden danach aktiver. Die ∝-Gluc, andere Peptidasen und die Lac beobachtet man später als die aP und APM und nur im Zotten- und z. T. Kryptenepithel; und zwar am 39., 45. bzw. 48. ET. Die Aktivität der ∝-Gluc, Peptidasen und Lac steigt später ebenfalls aber weniger als die der aP und APM an. - Zwischen dem 48. und 56. ET reagieren im Lumen von Jejunum und Ileum (Abb. 10) die aP und ∝-Gluc positiv und werden intraluminal die NA-Substrate zum Peptidasennachweis umgesetzt.

L y s o s o m a l e H y d r o l a s e n

ß - D - N - A c e t y l g l u c o s a m i n i d a s e

Die ß-D-N-Acetylglucosaminidase (NAG) reagiert erstmalig am 22. ET positiv. Der Farbstoff liegt im basalen Cytoplasma der Zellen des mehrreihigen Epithels, die an das Mesenchym grenzen und bildet an der Epithel-Mesenchym-Grenze einen schmalen Saum bzw. Schlauch; oder das Reaktionsprodukt ist in diffus verstreuten Granula lokalisiert. Diese Lokalisation ändert sich bis zum 26. ET nicht; die Farbstoffmenge nimmt

zu. Am 28. ET (Abb. 11) ist das Reaktionsprodukt durch das ins Epithel eindringende Mesenchym wellenförmig angeordnet. Am 29. ET (Abb. 12) tritt die NAG zusätzlich vereinzelt in lumennahe gelegenen Gruppen von Epithelzellen oder überall im mehrschichtigen Epithel auf. Am 36. ET liegt der Azofarbstoff im basalen Cytoplasma des einschichtigen Epithels, hat zugenommen, und bevorzugt hier manchmal das Gebiet der Zottenspitzen; am 37. ET ist er auch apikal zu beobachten. Im Ileum sieht man basal und apikal Farbstoffgranula, im Jejunum nur apikal. In der Folgezeit (Abb. 13, 14) wird vor allem im apikalen Cytoplasma der Enterocyten vermehrt Azofarbstoff produziert; der meiste Azofarbstoff ist in den Enterocyten des oberen und mittleren Zottendrittels untergebracht. Etwa ab dem 53. ET nimmt die Farbstoffmenge nicht mehr zu; die Enterocyten des Jejunum enthalten mehr Farbstoff als die im Ileum. Die Enterocyten des oberen Zottendrittels reagieren am kräftigsten gefolgt von denen im mittleren; die im unteren Drittel besitzen wenig Azofarbstoff. An der Zotten-Krypten-Grenze und in den Krypten sind die Epithelzellen frei von Reaktionsprodukt. - Zwischen dem 60. und 63. ET (Abb. 15) finden sich vereinzelt kräftig positiv gefärbte Makrophagen im Zottenstroma.

ß - D - G l u c u r o n i d a s e

Die Lokalisation der ß-D-Glucuronidase (ß-Gluc) entspricht pränatal der der NAG; die Aktivität ist wenigstens bis zum 35. ET weit weniger als die der NAG und ändert sich kaum. Später steigt die Menge Azofarbstoff in den Enterocyten an; zusätzlich reagiert vor allem um den 36. ET ihr Plasmalemm positiv. Gegenüber vorher ist die ß-Gluc am 36. und 37. ET

aktiver als die NAG, die danach wieder mehr Farbstoff produziert; Jejunum (Abb. 16) und Ileum verhalten sich gleich.

S a u r e P h o s p h a t a s e

Die saure Phosphatase (sP) ist ab dem 26. ET nachweisbar. Lokalisation und Menge des Reaktionsproduktes gleichen bis zum 37. ET weitgehend der NAG. Am 41. ET ist die Aktivität der sP in den Enterocyten des unteren Zottendrittels am höchsten; die des mittleren reagieren schwach; in den Enterocyten des oberen Zottendrittels und im Kryptenepithel ist das Enzym nicht nachweisbar. Am 42. ET hat die sP-Aktivität gegenüber vorher zugenommen und steigt bis zum 46. ET vor allem im mittleren Zottendrittel massiv an. Zwischen dem 46. und 49. ET tritt die sP auch in den Enterocyten des oberen Zottendrittels auf; hiervon ist zunächst das Jejunum und 1-2 Tage später das Ileum betroffen. Am 51. ET bestehen zwischen beiden Anteilen des Dünndarms keine eindeutigen Reaktionsunterschiede mehr. Die Enterocyten des oberen und mittleren Zottendrittels besitzen im apikalen Cytoplasma identische Quantitäten an homogenem oder granulärem Azofarbstoff, die im unteren verfügen über mehr und nur granulären. Zwischen dem 51. ET und der Geburt verhalten sich Jejunum und Ileum gleich; Veränderungen fehlen.

α - D - M a n n o s i d a s e

Die α-D-Mannosidase (α-Man) tritt am 35. ET auf; im Jejunum findet man das Enzym im basalen Cytoplasma aller Enterocyten, im Ileum nur in einigen. In beiden Dünndarmanteilen enthalten allein die Saumzellen des oberen Zottendrittels Reaktionsprodukt. Am 36. ET hat die Aktivität der α-Man zugenom-

men. Am 37. und 39. ET liegt der Azofarbstoff im Gebiet der Enterocytenkerne, zwischen dem 41. und 50. ET vor allem unterhalb der Mikrovilli; die Zellkerne sind weiter braun gefärbt. Am 51. ET (Abb. 17) ist das Enzym verglichen mit vorher aktiver und produziert jetzt in den Enterocyten des oberen und mittleren Drittels der Jejunum- und Ileumzotten geringe Mengen Azofarbstoff. Maximal aktiv ist die α-Man z. Zt. der Geburt (Abb. 18); das Jejunum dominiert. Alle Enterocyten des oberen und mittleren Villusdrittels sind hier im apikalen Cytoplasma mit granulärem Reaktionsprodukt vollgestopft; das untere Drittel reagiert schwächer, die Enterocyten an der Zotten-Krypten-Grenze negativ.

α - D - G a l a c t o s i d a s e

Die α-D-Galactosidase (α-Gal) ist bis zum 55. ET nicht faßbar. Am 56. und 63. ET sieht man apikal in den Enterocyten aller Zottenabschnitte von Jejunum und Ileum wenig braunen Farbstoff.

S a u r e ß - D - G a l a c t o s i d a s e

Mit beiden Nachweismethoden kommt die saure ß-D-Galactosidas (sß-Gal) ab 51. ET vor. Mit dem Indigogenverfahren liegt das türkisfarbene, fleckförmige Reaktionsprodukt überall im apikalen Enterocytencytoplasma, mit der Azoindoxylmethode brauner granulärer Farbstoff in relativ geringer Menge nur direkt unter der Mikrovillizone. Die verschiedenen Zottenabschnitte verhalten sich in Jejunum und Ileum gleich. Ab 53. ET steigt die Enzymaktivität nicht mehr eindeutig an.

Unspezifische Esterase

Die unspezifische Esterase (uE) produziert in nativen Schnitten weniger Azofarbstoff als nach Formaldehydfixation und setzt 1-Naphthylacetat an allen untersuchten ET, Naphthol-AS-, Indoxyl-, 5-Br-3-Indoxyl-, 5-Br-4-Cl-3-Indoxyl- sowie Naphthol-AS-D-acetat nur an einigen ET, Naphthol-AS-TR- und Naphthol-AS-D-chlor-acetat nicht um; am schnellsten wird 1-Naphthylacetat hydrolisiert. Am 26. ET (Abb. 19) kommt mit 1-Naphthylacetat als Substrat Azofarbstoff vor allem basal im Cytoplasma der Epithelzellen und vereinzelt in diffus im Epithel verstreuten Granula vor, die an das Zottenstroma grenzen; Die Reaktionsintensität nimmt bis zum 30. ET zu; außerdem reagieren dann die Zellkerne mit. Zwischen dem 35. ET und Geburtstermin (Abb. 20) ändert sich die Farbstoffmenge nicht mehr eindeutig. Die Zellkerne sind weiterhin gefärbt. Krypten- und Zottenepithel verhalten sich gleich und besitzen überall im Cytoplasma große Mengen Azofarbstoff. Zusätzlich reagiert das laterale Plasmalemm der Enterocyten ubiquitär positiv.

Vergleicht man die sauren und größtenteils lysosomalen Hydrolasen, kommen als erste die NAG und ß-Gluc (22. ET bzw. 26. ET) vor; es folgen die sP und uE am 26. ET, die α-Man am 35. ET, die sß-Gal am 51. ET und die α-Gal am 56. ET. Die NAG, ß-Gluc, sP und uE finden sich schon im mehrschichtigen (mehrreihigen) Epithel, die anderen Hydrolasen nur im Zottenepithel. Am aktivsten sind die NAG, uE, sP, α-Man und ß-Gluc; geringe Mengen Farbstoff produzieren die sß-Gal und α-Gal. - Zwischen dem 46. und 56. ET (Abb. 21, 22, 23, 24) treten die NAG, ß-Gluc, sP, α-Man und uE in großen Granula und Vakuolen

vereinzelt in Enterocyten oder Enterocytengruppen im oberen Zottendrittel und gehäuft im Lumen von Jejunum und Ileum auf.

B i o c h e m i e

K i n e t i s c h e U n t e r s u c h u n g e n

Wegen der hohen Enzymaktivitäten (HARTMANN und GOSSRAU 1978) wurden die optimalen Ansätze für die mikrovillären Hydrolasen mit Dünndarmhomogenaten vom 1.-5. LT und für die lysosomalen mit solchen vom 55.-63. ET ermittelt. - Bei Nachbehandlung der Proben mit NaOH und Na-Bicarbonat ist die Ausgangsfluoreszenz von 1-Naphthol (1N) und Methylumbelliferon (MU) etwa gleich hoch, aber nur bei Verwendung von Na-Bicarbonat über 10 Tage stabil. Nach Alkalisierung mit NaOH sinkt die Fluoreszenzintensität von 1N innerhalb von 2 h auf ca. 66% der Ausgangsfluoreszenz ab.

M i k r o v i l l ä r e H y d r o l a s e n

Die kinetischen Untersuchungen der alkalischen Phosphatase, ß-D-Glycosidasen und α-D-Glucosidasen erfolgten ausschließlich mit Methylumbelliferyl(MU)substraten. Die mit diesen Substraten ermittelten pH-Optima, K_m-, und V_{max}-Werte sowie optimalen Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Die K_i für Gluconolacton und Galactonolacton beträgt mit MU-

ß-D-glucosid als Substrat 0,5 mM bzw. 0,21 mM, für Gluconolacton und mit MU-ß-D-fucosid als Substrat 0,77 mM; die K_m wird in allen Fällen größer, die V_{max} kleiner. Bei pH 6 und 26. LT wird die Hydrolyse von 1 mM MU-ß-D-glucosid durch Gluconolacton, Galactonolacton, pCMB und Lactose zu 96%, 41%, 95% bzw. 3%, die von 1,5 mM MU-ß-D-cellobiosid zu 89%, 92%, 96% bzw. 28% gehemmt.

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde 30 min inkubiert; die Konzentration von MU-phosphat betrug 4 mM, von MU-α-D-glucosid, MU-ß-D-glucosid, MU-ß-D-galactosid und MU-ß-D-fucosid 3 mM und von MU-ß-D-cellobiosid 2 mM. Zur Ermittlung der K_m und V_{max} sowie optimalen Substratkonzentrationen wurden Substratmengen zwischen 0,0468 mM und 12 mM verwendet; die Inkubationszeit betrug 30 min; die pH-Werte entsprachen dem pH-Optimum. Mit allen Substraten läuft die Reaktion über mindestens 20 min linear ab; eine Ausnahme macht MU-phosphat, das nur während der ersten 5 min linear umgesetzt wird.

L y s o s o m a l e H y d r o l a s e n

Zur kinetischen Untersuchung der ß-D-N-Acetylglucosaminidase (NAG), α-D-Mannosidase (α-Man), α-D-Galactosidase (α-Gal), ß-D-Glucuronidase (ß-Gluc), sauren ß-D-Galactosidase (sß-Gal) und sauren Phosphatase (sP) wurden MU- und 1-Naphthylsubstrate benutzt. Die damit erhaltenen pH-Optima, K_m- und V_{max}-Werte sowie optimalen Substratkonzentrationen und Inkubationszeiten sind in Tab. 2 zusammengestellt. - Das pH-Optimum wurde mit 2,6 mM MU-ß-D-N-Acetylglucosaminid, 3 mM MU-α-D-mannosid, MU-α-D-galactosid und MU-ß-D-galactosid,

2,5 mM MU-ß-D-glucuronid und 4 mM MU-phosphat ermittelt; bei den 1-Naphthyl(1N)substraten betrug die Konzentration für 1N-ß-D-N-acetylglucosaminid 3,1 mM, für 1N-α-D-mannosid, 1N-α-D-galactosid und 1N-ß-D-galactosid 3,3 mM, für 1N-ß-D-glucuronid 3 mM und für 1N-phosphat 4 mM; sonst wurde methodisch wie bie den Kinetikstudien der mikrovillären Hydrolasen vorgegangen. Linearer Reaktionsverlauf besteht für die α-Man, α-Gal und sß-Gal bis mindestens 20 min, für die NAG und sP bis 5 min.

Angewandte Untersuchungen

Mikrovilläre Hydrolasen

Meistens erfolgten die Messungen bis zum 42. ET mit Homogenaten des gesamten Dünndarms, danach getrennt mit Jejunum und Ileumhomogenaten.

Alkalische Phosphatase (Abb. 25)
Mit MU-phosphat als Substrat steigt der Umsatz ab 28 . ET bis zum 50. ET an; die Hydrolyseraten können an verschiedenen ET bis zu 50% variieren. Zwischen dem 55. und 59. ET fällt die Aktivität vorübergehend um 21% ab und steigt danach über die Geburt hinaus bis zum 2. LT an; zwischen dem 3. und 15. LT sinkt der Umsatz um 10%, später kaum mehr ab. Jejunum- und Ileumaktivität differieren pränatal nicht nennenswert; der Umsatz ist im Jejunum 8,6% höher als im Ileum; postnatal sind die Aktivitätsunterschiede der aP zwischen Jejunum und Ileum noch geringer.

α - D - G l u c o s i d a s e n (Abb. 26)

Ähnlich der aP schwankt die Hydrolyserate mit MU-α-D-glucosid zwischen dem 32. und 42. ET; insgesamt nimmt sie zu. Während der folgenden ET steigt die Aktivität in beiden Dünndarmabschnitten kontinuierlich an, erreicht im Jejunum am 54. ET und im Ileum am 55. ET ein vorläufiges Maximum, fällt danach überall im Dünndarm bis zum 56. bzw. 59. ET ab und hat am Geburtstermin ein neues Maximum, das im Jejunum etwas höher als im Ileum liegt. Postnatal geht die Hydrolyserate im Jejunum und Ileum 2 mal passager zurück und entspricht am 10. LT weitgehend der erwachsener Tiere. Das Ileum ist während der 1. 2 LW aktiver als das Jejunum, später das Jejunum 12% aktiver.

ß - D - G l y c o s i d a s e n

MU-ß-D-glucosid (Abb. 27) wird bis zum 43. ET vom Gesamtdünndarmhomogenat langsam, anschließend von Jejunum und Ileum etwas schneller hydrolisiert. Der steilste Anstieg ist im Jejunum zwischen dem 52. und 54. ET, im Ileum zwischen dem 53. und 55. ET zu beobachten; das Jejunum ist um 20% aktiver als das Ileum. Danach geht der Umsatz bis zum 59. ET im Jejunum um 39%, im Ileum um 65% zurück. Ab dem 61. ET wird MU-ß-D-glucosid im Jejunum und Ileum wieder vermehrt umgesetzt; den stärksten Hydrolyseanstieg beobachtet man zwischen dem Geburtstermin und 5. LT. Bis zum 10. LT sinkt die Aktivität lediglich im Ileum um 18% ab und ändert sich danach nicht mehr. Jejunum und Ileum unterscheiden sich bei den postnatalen Hydrolyseraten um 25%.

MU-ß-D-cellobiosid (Abb. 28) wird pränatal kaum hydroli-

siert. Mit der Geburt steigt die Umsatzrate vor allem im Jejunum und weniger auffällig im Ileum an und ist zwischen dem 3. und 15. LT im Jejunum, im Ileum am 5. LT am höchsten; die Differenzen zwischen Jejunum und Ileum betragen am 5. LT 23,1%. Im Ileum geht der Umsatz bereits nach dem 5., im Jejunum erst nach dem 15. LT zurück. Am Ende des 1. LM wird das Substrat nicht mehr meßbar hydrolisiert.

MU-ß-D-fucosid (Abb. 28) wird bis zum 41. ET kaum, danach verstärkt und maximal in Jejunum und Ileum am 54. ET umgesetzt; die Hydrolyseraten sind im Ileum 21% geringer als im Jejunum. Zwischen dem 56. und 61. ET verlieren Jejunum und Ileum 40% ihrer Aktivitäten. Z. Zt. der Geburt hat das Jejunum wieder die Aktivität des 54. ET erreicht; das Ileum ändert seinen Umsatz gegenüber vorher nicht; er beträgt am Geburtstermin 31% des im Jejunum. Unmittelbar postpartal nehmen die Hydrolyseraten in beiden Dünndarmabschnitten bis zum 3. LT stark zu. Verglichen mit den Umsätzen am 63. ET steigt die Hydrolyserate im Jejunum um 124%, im Ileum um 576%; das Jejunum ist am 1. LT 49%, am 2. LT lediglich 4% aktiver als das Ileum. Zwischen dem 3. und 10. LT sind die Aktivitätsdifferenzen zwischen den beiden Anteilen des Dünndarms gering. Der anschließende Aktivitätsabfall ist im Ileum stärker als im Jejunum; er beträgt bezogen auf das postnatale Aktivitätsmaximum am 3. LT für das Jejunum 29,2%, für das Ileum 41%. Die Aktivität des erwachsenen Meerschweinchens ist am 30. LT erreicht.

MU-ß-D-galactosid wird bis zum 41. bzw. 44. ET in Jejunum und Ileum wenig und etwa gleich schnell umgesetzt; am 44. ET

ist das Jejunum um 4% aktiver als das Ileum. Bis zum 54. ET steigt die Hydrolyserate speziell im Jejunum an. Nach dem 57. ET nimmt der Umsatz über die Geburt hinaus in beiden Dünndarmabschnitten zu und ist am 3. LT gegenüber der Aktivität am Geburtstermin im Jejunum um 54%, im Ileum um 58% angestiegen, so daß beide Anteile jetzt nahezu gleich aktiv sind. Nach dem 5. LT sinken die Umsätze um 35% ab; die Erwachsenenaktivität findet man nach dem 1. LM.

Vergleicht man die prä- und postnatale Hydrolyserate der mikrovillären Hydrolasen, hat die aP immer die höchsten Umsätze; das Aktivitätsmaximum (100%) ist am 50. ET erreicht. Der Aktivitätsverlauf der α-D-Glucosidasen ähnelt pränatal dem der aP; die Umsätze sind jedoch geringer und betragen am Geburtstermin 19,5% der aP-Hydrolyserate. Bei Messung der ß-D-Glycosidasen liefern MU-ß-D-glucosid, MU-ß-D-galactosid und MU-ß-D-fucosid etwa gleiche, MU-ß-D-cellobiosid abweichende Resultate; im Gegensatz zu den erstgenannten Glycosiden wird MU-ß-D-cellobiosid pränatal praktisch nicht, mit Beginn der Postnatalzeit plötzlich zunehmend hydrolisiert (Steigerung um 950%). Bezogen auf die aP beträgt der Umsatz der ß-D-Glycosidasen am Geburtstermin mit MU-ß-D-galactosid, MU-ß-D-fucosid, MU-ß-D-glucosid und MU-ß-D-cellobiosid 14,4%, 11,0%, 11,0% bzw. 0,4%, am 3. LT mit den gleichen Substraten 21,0%, 24,6%, 18,0% bzw. 8,2%.

Lysosomale Hydrolasen

Saure ß-D-Galactosidase (Abb. 29)

In Homogenaten vom gesamten Dünndarm steigt die Aktivität

zwischen dem 34. und 41. ET unauffällig, danach im Jejunum und Ileum innerhalb von 2 Tagen um 34,7% an. Diese Umsatzraten bleiben bis zum 47. ET nahezu unverändert; das Jejunum ist wenig aktiver als das Ileum. Anschließend nimmt die Hydrolyserate in beiden Dünndarmabschnitten kontinuierlich über den Geburtstermin hinaus bis zum 3. bzw. 2. LT zu; danach fällt sie im Jejunum zunächst schnell, im Ileum allmählich ab und beträgt am 30. LT nur noch 47,7% der Aktivität am 3. LT, im Ileum noch 36,5% der am 2. LT; bis zu diesem Zeitpunkt sind die Aktivitätsdifferenzen zwischen Jejunum und Ileum gering; ab dem 10. LT vergrößern sich die Unterschiede, da der Umsatz im Ileum stärker als im Jejunum zurückgeht. Mit Beginn der 3. LW ändert sich die Aktivität nicht mehr signifikant.

ß - D - N - A c e t y l g l u c o s a m i n i d a s e (Abb. 30)
Im Gesamtdünndarmhomogenat nimmt die Hydrolyserate zwischen dem 28. und 42. ET um 79,2%, zwischen dem 43. und 63. ET in Jejunum und Ileum um 51,6% zu; vor allem zwischen dem 28. und 44. ET, in geringerem Maße in Jejunum und Ileum bis zum 59. ET weist der Umsatz an verschiedenen ET beträchtliche Schwankungen auf. Die Aktivität beider Dünndarmabschnitte ist praktisch gleich. Das Aktivitätsmaximum erreichen Jejunum und Ileum z. Zt. der Geburt. Der Abfall der NAG-Aktivität beginnt im Jejunum sofort danach, im Ileum 2 Tage später und verläuft steil, so daß am 5. LT nur noch 55,2% der Aktivität wie zum Zeitpunkt der Geburt vorhanden ist. Der weitere Aktivitätsverlust vollzieht sich speziell im Ileum weniger abrupt als vorher. Am 10. LT sind Jejunum und Ileum gleich aktiv und verfügen um den 30. LT über die Aktivi-

tät erwachsener Meerschweinchen.

α - D - M a n n o s i d a s e (Abb. 31)

In Homogenaten vom gesamten Dünndarm nimmt der Umsatz zwischen dem 34. und 41. ET um 40%, zwischen dem 41. und 42. ET um über 100% zu. Zwischen dem 43. und 53. ET steigt die Aktivität der α-Man im Jejunum und Ileum mäßig, anschließend massiv an; der Aktivitätsanstieg beträgt 56,5%. Das Umsatzmaximum fällt im Jejunum mit der Geburt zusammen; im Ileum ist es am 2. LT erreicht. Noch schneller als der pränatale Aktivitätsanstieg vollzieht sich der postnatale Aktivitätsverlust; er beginnt im Jejunum am 1. LT, im Ileum am 3. LT. Am 5. LT ist die Hydrolyserate im Jejunum um 81%, im Ileum um 83% abgesunken. Um den 15. LT entspricht die α-Man-Aktivität der erwachsener Meerschweinchen; das Jejunum ist um 30% aktiver als das Ileum.

α - D - G a l a c t o s i d a s e (Abb. 32)

Die Hydrolyserate ist zwischen dem 34. und 41. ET unverändert niedrig oder am 41. ET abgefallen. Ab 42. ET steigt die Aktivität der α-Gal in Jejunum und Ileum bis zur Geburt langsam an und gleicht sich in beiden Dünndarmabschnitten weitgehend; das Jejunum erreicht seine Maximalaktivität am 63. ET, das Ileum am 2. LT. Am 5. LT mißt man in beiden Dünndarmabschnitten praktisch die α-Gal-Aktivität erwachsener Meerschweinchen; das Ileum ist bis zum 10. LT aktiver als das Jejunum; später hat das Jejunum 15% höhere Umsatzraten.

ß - D - G l u c u r o n i d a s e (Abb. 33)

Die Aktivität der ß-Gluc steigt zwischen dem 34. und 46. ET

schnell, bis zum 61. ET langsam und ändert sich danach im Jejunum und Ileum kaum noch; beide Dünndarmabschnitte haben etwa identische Hydrolyseraten; nur zwischen dem 43. und 49. ET liegen die Umsätze im Ileum ca. 13% unter den Jejunumwerten. Das Aktivitätsmaximum des Jejunum fällt mit dem Geburtstermin zusammen; im Ileum liegt es am 2. LT. Danach gehen die Hydrolyseraten überall im Dünndarm zurück. Am 5. LT beträgt die Aktivität im Jejunum 55%, im Ileum am 12. LT 46,4% der Maximalaktivität; beide Dünndarmanteile sind dann gleich aktiv. Nach dem 12. LT bleibt die Aktivität der ß-Gluc weitgehend konstant; es finden sich in Jejunum und Ileum bis zum 33. LT nur leichte Umsatzanstiege, denen ein erneuter Abfall folgt.

Die prä- und postnatale Hydrolyserate von MU-phosphat im sauren entspricht praktisch der im alkalischen Bereich. Die Umsatzraten sind nahezu identisch.

Der Vergleich der Hydrolyseraten der lysosomalen Enzyme ergibt, daß am Geburtstermin die NAG am aktivsten ist (100%), gefolgt von der ß-Gluc (21,8%), α-Man (21%), sß-Gal (16,1%) und α-Gal (11,3%). Am 5. LT liegen die Umsätze der ß-Gluc, α-Man, sß-Gal und α-Gal bezogen auf die NAG bei 21,7%, 7,3%, 26,1% bzw. 12,3%. Postnatal fällt die Aktivität der α-Man am schnellsten, etwas langsamer die der NAG und ß-Gluc ab. Am langsamsten vollzieht sich der Aktivitätsabfall bei der α-Gal und ß-Gal.

DISKUSSION

Vorliegende Untersuchung beschäftigt sich erstmals breit und zusammenhängend mit den Hydrolasen während der pränatalen und z. T. auch postnatalen (vgl. HARTMANN und GOSSRAU 1978) Entwicklung des Dünndarmepithels beim Meerschweinchen und hat methodische und angewandte Aspekte. Methodisch zeigt sich, daß biochemische Hydrolasenmessungen mit Methylumbelliferonsubstraten den Verfahren mit Naphtholderivaten überlegen sind und erst die Kombination biochemischer und histochemischer Methoden in etwa Auskunft über die Rolle der lysosomalen und membrangebundenen Hydrolasen während der Darmentwicklung liefern kann; außerdem wird ein neues Verfahren zur biochemisch-fluorometrischen Messung der Lactase-ß-D-glucosidase mit Methylumbelliferyl-ß-D-fucosid mitgeteilt, das den bisherigen Methoden mit künstlichen und natürlichen Substraten (DE GROOT und HOOGENDORN 1957, KOLDOVSKÝ et al. 1966, ROMMEL und BÖHMER 1974) überlegen und auch für mikrochemische Zwecke geeignet ist (GOSSRAU unveröff.). Der angewandte Teil unserer Studie macht klar, daß die meisten Differenzierungsschritte pränatal ablaufen, speziell im Epithel mit spektakulären Veränderungen einhergehen und sein Hydrolasensystem mit der Geburt oder kurz danach ausgereift ist; die Entwicklung der Stromahydrolasen der Dünndarmschleimhaut läuft bei der Untersuchung mit den hier benutzten qualitativ-histochemischen und biochemischen Methoden weniger dramatisch ab und ist später beendet.

Biochemische und histochemische Methoden

Der Vorteil der Methylumbelliferonsubstrate gegenüber den Naphtholderivaten zur Messung saurer Hydrolasen im Dünndarm hat kinetische und meßtechnische Gründe. Mit allen geprüften Methylumbelliferylverbindungen sind die Michaeliskonstanten (K_m) dieser Enzyme kleiner und ihre maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) größer als bei Verwendung der jeweiligen 1-Naphtholsubstrate. Entsprechend niedrig liegen mit den Methylumbelliferylglycosiden und -phosphaten die optimalen Substratkonzentrationen bzw. relativ geringe Substratmengen reichen für Messungen im V_{max}-Bereich aus, wodurch die Nachweismethoden verglichen mit den Naphtholsubstratansätzen billiger sind. Die gegenüber den Naphthylglycosiden und -phosphaten schnellere Hydrolyse der Methylumbelliferonsubstrate bringt mit sich, daß sie empfindlicher sind bzw. die Erfassung geringerer Enzymaktivitäten erlauben und Hydrolasen damit während der Darmentwicklung früher als mit den Naphthylverbindungen erfaßt werden können. Daher kommen lediglich die Methylumbelliferonverbindungen auch für mikrochemische Glycosidasen- und Phosphatasenmessungen in einzelnen oder Gruppen von Epithel- und Stromazellen in Frage, mit denen wir im Dünndarm prä- und postnataler Meerschweinchen begonnen haben.

Meßtechnisch sind die von uns benutzten Methylumbelliferylglycoside und -phosphate den 1-Naphthylsubstraten überlegen, weil unabhängig vom verwendeten Alkalisierungsmittel Methylumbelliferon das stabilere Fluorogen darstellt und

etwa 100 mal intensiver fluoresziert als äquimolare Konzentrationen von 1-Naphthol (LEABECK 1975, Lit.). Die hier nicht eingesetzten 2-Naphthylsubstrate sind den Methylumbelliferylverbindungen kinetisch und meßtechnisch in der Regel ebenfalls unterlegen, den 1-Naphthylverbindungen aber überlegen (UNDENFRIEND 1962, 1969, GOSSRAU 1977 a, b, HARTMANN und GOSSRAU 1978). Außerdem zeichnen sich die Methylumbelliferonsubstrate durch geringe Eigenfluoreszenz und hohe Stabilität aus.

Nachteil von Methylumbelliferon und 1-Naphthol ist, daß beide erst nach Alkalisierung optimal und intensiv fluoreszieren und deshalb fortlaufende bzw. kinetische Messungen, die allein zuverlässig Auskunft über initiale und maximale Umsatzraten geben, im neutralen und vor allem sauren pH-Bereich nicht oder nur mit Einschränkungen möglich sind. Soll hingegen zusätzlich intrazellulär lokalisiert werden, eignen sich dazu nur 1-Naphthylsubstrate und mit Einschränkungen die 2-Naphthylverbindungen (GOSSRAU 1975 b, 1976 a, LOJDA et al. 1976, 1979); obwohl Methylumbelliferon wenigstens im Reagensglas mit verschiedenen Diazoniumsalzen schnell kuppelt und ausfällbare Farbstoffe bildet (GOSSRAU 1980 a). Lediglich Methylumbelliferylphosphat (GOSSRAU unveröff.) liefert wie Methylumbelliferylsulfat (GOSSRAU unveröff., vgl. SCHOFIELD et al. 1979: Methylumbelliferylpyrophosphat) im Rahmen von Metallsalzverfahren bei der licht- und elektronenmikroskopischen Lokalisation von unspezifischen Phosphatasen bzw. Sulfatasen auch im Dünndarmepithel vom Meerschweinchen gute Resultate.

Einblicke in das Verhalten der lysosomalen und membrangebundenen Hydrolasen während der Darmentwicklung beim Meerschweinchen (und bei der Untersuchung von Hydrolasen während der Ontogenese ganz allgemein) sind nur möglich, wenn histochemische und biochemische Methoden gemeinsam benutzt werden. Ursache dafür ist, daß die verwendeten histochemischen Hydrolasennachweise mit Diazoniumsalzen und anderen Hilfsreagentien arbeiten und z. T. zusätzlich erst nach Fixation des Dünndarms mit Formaldehyd durchgeführt werden; beide inhibieren (GOSSRAU 1976 a, Lit., 1980 a, LOJDA et al. 1976, 1979) und verhindern dadurch exakte Angaben über das erste Auftreten der Hydrolasen und ihre tatsächliche Aktivität (vgl. GOSSRAU 1975 b); z. B. sind die α-D-Glucosidasen biochemisch schon am 32. ET und vor der endgültigen Zottenentstehung, histochemisch aber erst am 39. ET bzw. parallel zur Ausbildung von Sekundärzotten faßbar. Anhand rein histochemischer Befunde würde man die α-D-Glucosidasen zu den Hydrolasen rechnen, die erst auftreten, wenn typische Bürstensäume existieren; tatsächlich zählen diese Enzyme wie die alkalische Phosphatase und Aminopeptidase M jedoch zu den Hydrolasen, die bereits im undifferenzierten mehrreihigen Dünndarmepithel vorhanden sind. Sämtliche lysosomalen Glycosidasen lassen sich biochemisch ab dem 28. oder 34. ET messen; histochemisch sind dann nur die ß-D-N-Acetylglucosaminidase und ß-D-Glucuronidase zu fassen, die saure ß-D-Galactosidase, α-D-Mannosidase und α-D-Galactosidase aber nicht. Darüberhinaus entgeht der histochemischen Untersuchung aller membrangebundenen Hydrolasen der Aktivitätsabfall unmittelbar vor der Geburt und der sofort postpartal zu beobachtende Anstieg der membrangebundenen und/

oder cytoplasmatischen ß-D-Glycosidasen.

Günstigere Resultate als mit den Farbstoffmethoden (Azo-, Azoindoxyl-, Indigogenverfahren) erwarten wir vom histochemisch-fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Glykosidasen, Phosphatasen, Carboxylesterasen und Peptidasen mit Naphthol-AS- (BURSTONE 1962, PRENNA et al. 1977) und Naphthylamin-AS-Substraten (GOSSRAU unveröff.) kombiniert mit semipermeablen Membranen in Abwesenheit der hemmenden Diazoniumsalze und Aldehyde.

Umgekehrt ist es im Gegensatz zur histochemischen Darstellung selbst mit den entsprechenden mikrochemischen Methoden und Methylumbelliferylsubstraten ausgeschlossen Information über die Lokalisation der Hydrolasen in bestimmten Organellen oder Oberflächenmembranen der immer heterogen gebauten Darmwand zu erhalten; z. B. trägt die biochemische Hydrolasenmessung allein kaum oder nichts zum Verständnis der Rolle der sauren Hydrolasen im Rahmen der Villogenese bzw. dem physiologischen Zelltod bei.

Das Spezifitätsproblem der von uns eingesetzten Substrate betrifft biochemische und histochemische Hydrolasennachweise in gleichem Maße; denn beide arbeiten mit künstlichen Substraten, die grundsätzlich von mehreren Enzymen angegriffen werden können (LOJDA et al. 1976, 1979, Lit.). Betroffen sind vor allem die membrangebundenen Glykosidasen (SEMENZA 1968, 1977, KRAML und LOJDA 1977) und Peptidasen (KENNY 1977), und in geringerem Maße die Peptidasen der Lysosomen im Meerschweinchendarm.

Für die Glycosidasen der Pränatalzeit dürfte Gleiches gelten wie für die im postnatalen Dünndarm mit Naphthylsubstraten gemessenen Enzyme (HARTMANN und GOSSRAU 1978), so daß wir mit Methylumbelliferyl-α-D-glucosid offenbar die Glucoamylase, Saccharase und Isomaltase und mit Methylumbelliferyl-ß-D-fucosid die Lactase erfaßt haben (LOJDA et al. 1973, HIRŠOVÁ et al. 1977). Methylumbelliferyl-ß-D-glucosid wird möglicherweise wie 1-Naphthyl-ß-D-glucosid (LOJDA et al. 1973, Lit., HIRŠOVÁ et al. 1977, HARTMANN und GOSSRAU 1978, Lit.) von der Lactase und Hetero-ß-D-glycosidase umgesetzt. Unsere K_i-Bestimmungen für Gluconolacton und Galactonolacton und mit dem Lactase- und potentiellem Hetero-ß-D-glycosidasesubstrat Methylumbelliferyl-ß-D-glucosid sowie dem Lactasesubstrat Methylumbelliferyl-ß-D-fucosid helfen hier nicht weiter; sie demonstrieren lediglich, daß mit beiden Glycosiden offenbar ein Gemisch aus kompetitiv und nicht-kompetitiver Hemmung (AHLERS et al. 1974, BISSWANGER 1979) resultieren kann. Ob die Hydrolyse des künstlichen Trisaccharids Methylumbelliferyl-ß-D-cellobiosid von einer eigenständigen ß-D-Glycosidase bzw. Cellobiosidase (Cellobiase) oder der Lactase bewerkstelligt wird (HIRŠOVÁ et al. 1977), ist augenblicklich nicht eindeutig zu entscheiden; speziell die postnatal unterschiedlichen Aktivitätskurven mit Methylumbelliferyl-ß-D-fucosid und -cellobiosid als Substraten könnten Hinweis darauf sein, daß es sich vielleicht um differente ß-D-Glycosidasen handelt. Wenig informativ sind in diesem Zusammenhang die Versuche der Hydrolysehemmung des Lactase-Substrates Methylumbelliferyl-ß-D-glucosid und Methylumbelliferyl-ß-D-cellobiosid mit Gluconolacton, Galactonolacton, pCMB und Lactose; denn

der Hemmer der sauren ß-D-Galactosidase pCMB (LOJDA 1970) inhibiert die Hydrolyse beider Substrate, während die Inhibitoren der Lactase und sauren ß-D-Galactosidase Lactose und Galactonolacton bevorzugt den Umsatz von Methylumbelliferyl-ß-D-cellobiosid reduzieren. Methylumbelliferon statt Naphthol im Substratmolekül beeinflußt die Spezifität vermutlich nicht. Der Aktivitätsverlauf könnte dagegen von der Art des unspezifischen Restes abhängen; z. B. haben die α-D-Glucosidasen mit Methylumbelliferyl-α-D-glucosid praktisch am Geburtstermin ihr Aktivitätsmaximum, mit den 2-Naphthylsubstraten aber erst später erreicht (HARTMANN und GOSSRAU 1978). Hier wäre vorstellbar, daß unter den α-D-Glucosidasen die Saccharase und Isomaltase zwar das 2-Naphthylsubstrat langsam (LOJDA et al. 1973, GOSSRAU 1976 b, HARTMANN und GOSSRAU 1978), Methylumbelliferyl-α-D-glucosid jedoch schnell umsetzen.

Bei den Peptidasen haben wir mit Leu- und Ala-4-methoxy-2-naphthylamid überwiegend die Aminopeptidase M, mit Gly-Pro-4-methoxy-2-naphthylamid, Lys-Ala-4-methoxy-2-naphthylamid und Ala-Phe-Pro-4-methoxy-2-naphthylamid vor allem die Dipeptidylaminopeptidase IV und eventuell auch die Aminopeptidase M, mit Lys-Ala-4-methoxy-2-naphthylamid in den Lysosomen die Dipeptidylaminopeptidase II und mit γ-Glu-4-methoxy-2-naphthylamid sicherlich nur die γ-Glutamyltransferase erfaßt; hierfür sprechen in der Literatur angegebene (MCDONALD und SCHWABE 1977, KENNY 1977) und eigene Kontrollbefunde (LOJDA et al. 1976, 1979, LOJDA 1979, LOJDA und GOSSRAU 1980, GOSSRAU 1980 b, GOSSRAU und LOJDA 1980), z. B. mit spezifischen Inhibitoren und Aktivatoren oder den entsprechenden isolier-

ten und gereinigten Peptidasen. Bei der Messung und Lokalisation der ß-D-N-Acetylglucosaminidase, ß-D-Glucuronidase, α-D-Mannosidase und α-D-Galactosidase interferieren andere Glykosidasen, soweit bisher bekannt, nicht. An der Hydrolyse von Methylumbelliferylphosphat oder 1-Naphthylphosphat können sich bei saurem pH neben der sauren die alkalische Phosphatase und umgekehrt im alkalischen Mileu außer der alkalischen die saure Phosphatase beteiligen. Verglichen miteinander ist die Gefahr der Mitreaktion der alkalischen Phosphatase wegen ihrer verglichen mit der sauren Phosphatase wesentlich höheren Aktivität immer größer. 5-Br-4-Cl-3-Indoxyl-ß-D-galactosid, 1-Naphthyl-ß-D-galactosid und Methylumbelliferyl-ß-D-galactosid als Substrate der sauren ß-D-Galactosidase werden auch von der Lactase und Hetero-ß-D-glycosidase umgesetzt; der Hydrolyseanteil durch diese Hydrolasen fällt jedoch praktisch kaum ins Gewicht (LOJDA et al. 1973, 1976, 1979, HARTMANN und GOSSRAU 1978).

Differenzierungsphasen des pränatalen Darmepithels

Die enzymatische und morphologische Differenzierung des pränatalen Dünndarms beim Meerschweinchen ist ein fließender Vorgang, bei dem sich verschiedene Ereignisse überlappen bzw. zur gleichen Zeit ablaufen. Eine Gliederung in bestimmte Entwicklungsphasen und Einblicke in die Funktion, die dabei die membrangebundenen und lysosomalen Hydrolasen eventuell oder sogar sicher wahrnehmen, ist dennoch möglich, weil zu bestimmten Zeiten ganz bestimmte Vorgänge dominieren; dadurch läßt sich vor allem die Epithelentwicklung im

Dünndarm in folgende Phasen untergliedern: 1. die von uns kaum bearbeitete uniforme Proliferations- und Histogenesephase, die sich überwiegend vor dem 22. ET abspielt und um den 26. ET mit der Ausbildung des dreischichtigen Dünndarms endet; 2. die Phase der Villogenese zwischen dem 27. und 50. ET, an deren Beginn sich ein proximodistaler Gradient ausbildet bzw. zwischen Jejunum und Ileum unterschieden werden kann und die weitgehend mit der Epithel- und Stromadifferenzierung (Cytodifferenzierung) sowie dem Glykosidasenreichtum der Epithelzellen zusammenfällt und 3. die Phase der Funktionsvorbereitung und Funktionsaufnahme der Mucosa ab dem 51. ET bis über die Geburt hinaus.

1. Phase. Für die Proliferation des primitiven Darmepithels und die Ausbildung der dreischichtigen Darmwand durch Umwandlung von Mesenchym in glatte Muskulatur haben lysosomale und membrangebundene Hydrolasen vermutlich untergeordnete Bedeutung. Die unspezifischen Esterasen und ß-D-N-Acetylglucosaminidase sind beim histochemischen Nachweis in Lysosomen unmittelbar oberhalb der Basalmembran und die unspezifischen Esterasen zusätzlich überall in den Lysosomen im Epithel schwach positiv vertreten. Ob es sich in dieser Phase der Epithelentwicklung um mehrschichtiges oder mehrreihiges Epithel handelt, läßt sich nicht eindeutig beantworten. Berücksichtigt man die Vorgänge bei der Villogenese (s. u.), ist eher an ein mehrschichtiges Epithel zu denken, das sich später zum mehrreihigen umwandelt. Daß das primitive Darmepithel bereits frühzeitig spezialisiert ist bzw. unterschiedliche Aufgaben wahrnimmt, belegen die alkalische Phosphatase und Aminopeptidase M (HAVRÁNKOVÁ und LOJDA 1977,

vgl. aber ANDERSON und LEISSRING 1961, und möglicherweise die dann zumindest biochemisch faßbaren α-D-Glucosidasen), die z. B. am 22. ET nur im luminalen bzw. im Plasmalemm der ans Dünndarmlumen grenzenden Epithelzellen vorkommen. Vielleicht hydrolisieren und resorbieren allein diese Epithelzellen Substanzen aus dem Darmlumen, die sie für sich nutzen und/oder an die darunter gelegenen Epithelzellen abgeben und hier Ernährungsfunktion ausüben. Offen bleibt vorläufig, ob die Hydrolasen an das undifferenzierte Plasmalemm oder an bereits vorhandene Mikrovilli gebunden sind. Hier müssen elektronenmikroskopische Untersuchungen ebenso Klarheit schaffen, wie bei der Frage nach der Herkunft der Lysosomen. Ins Fruchtwasser applizierte Tracer, z. B. Ferritin, Tusche oder Peroxidase könnten Auskunft über schon oder noch nicht vorhandene Aufnahmemechanismen für Makromoleküle geben. Insgesamt verhält sich die 1. Phase der Pränatalentwicklung im Meerschweinchendünndarm unauffällig.

Im Mittelpunkt der 2. Phase (Cytodifferenzierung) stehen die Villogenese, die Einlagerung von Glykogen ins Epithel bzw. Glykogensynthesen und die Stroma- und Epitheldifferenzierung. An der Villogenese beteiligen sich offenbar Epithel und Mesenchym gemeinsam (PATZELT 1936); denn Zotten entstehen immer erst in dem Augenblick, in dem Mesenchym ins Epithel vordringt. Im Epithel selbst sind die lysosomalen Hydrolasen für die Zottenbildung wichtig, wobei zwischen frühen und späten Villogenesevorgängen unterschieden werden kann. Zu den frühen Vorgängen bei der Villogenese zählen im Epithel die Bildung von Spalten, die mit dem Darmlumen kommunizieren, und Löcher und die Anhäufung relativ großer Lysosomen mit ver-

gleichsweise hohen Aktivitäten an unspezifischen Esterasen, saurer Phosphatase, ß-D-N-Acetylglucosaminidase und ß-D-Glucuronidase (und unter Berücksichtigung der biochemisch meßbaren Aktivitätsanstiege auch der α-D-Mannosidase, α-D-Galactosidase und sauren ß-D-Galactosidase) in Gruppen von lumennahen Epithelzellen und um Epithelzellen, die den Spalten anliegen. Das Plasmalemm der an die intraepithelialen Löcher grenzenden Epithelzellen besitzt alkalische Phosphatase und Aminopeptidase M. Dies deutet darauf hin, daß parallel zueinander im mehrschichtigen Epithel lumennahe unter Beteiligung von Lysosomen und sauren Hydrolasen lokal Zellen sterben und in tieferen Schichten Epithelzellen ihren Kontakt untereinander aufgeben. Hierdurch entstehen Spalten und Löcher und werden Membranhydrolasen vielleicht als Folge einer aufgehobenen Kontakthemmung (NOVIKOFF und HOLTZMANN 1976, vgl. DE BAULT 1980) aktiv. Darüberhinaus ist vorstellbar, daß die Spalten mit den Löchern und die Löcher untereinander konfluieren, das Epithel sich abflacht (vgl. GOSSRAU 1975 b, MATHAN et al. 1975: Ratte, Maus), vom mehrschichtigen in den mehrreihigen Zustand übergeht und gleichzeitig das Mesenchym ins Epithel vorsproßt, wodurch Primärzotten entstehen. Intraepitheliale Spalten und Löcher ohne Mesenchyminvasion bzw. zunächst rein epitheliale Veränderungen gefolgt von einer Mesenchyminvasion haben wir dagegen nicht sicher beobachtet (vgl. aber Ratte und Maus: VOLLRATH 1969, GOSSRAU 1975 b, MATHAN et al. 1975). Offenbar ist beim Meerschweinchen zur Ausbildung von Primärzotten mit mehrreihigem Epithel und wenig oder noch undifferenzierten Mesenchymkern eine enge Kooperation bzw. Interaktion zwischen Mesenchym einerseits und Epithel andererseits notwendig.

Die späten Vorgänge der Villogenese betreffen die endgültige Ausbildung der definitiven oder Sekundärzotten. Es handelt sich neben der Umwandlung des mehrreihigen zum einschichtigen Epithel vor allem um den Zerfall bzw. Untergang des apikalen Zottendrittels bzw. um eine Verkürzung der Zotten. Hierbei gehen speziell Epithelzellen, vermutlich aber auch Stromazellen unter, kurz nachdem das gesamte Jejunum- und Ileumlumen nahezu vollständig von langen und sich gegenseitig berührenden Sekundärzotten ausgefüllt ist. Dann sieht man zunächst nur in den Enterocyten des apikalen Zottendrittels, kurz darauf aber auch im Lumen große Vakuolen mit hohen Aktivitäten speziell an unspezifischen Esterasen, ß-D-N-Acetylglucosaminidase und ß-D-Glucuronidase; intraluminal kommen zusätztlich Bürstensaumhydrolasen, z. B. die alkalische Phosphatase und Aminopeptidase M und hydrolasennegativer Zelldedritus (sowie vermutlich Glykogen) vor. Dies deutet darauf hin, daß passager extrem lange Sekundärzotten mit einem einschichtigen Epithel entstehen, die eventuell durch Berührung untereinander apikal absterben (Kontaktzelltod; vgl. Neuralrohrbildung: SCHLÜTER 1973, PEXIEDER 1975, Lit.) und sich zumindest im Epithel lysosomale Hydrolasen im Rahmen autophagischer Prozesse am Untergang der Enterocyten beteiligen; schließlich resultieren vergleichsweise kürzere endgültige Zotten.

Parallel zur Entstehung der Primär- und passageren Sekundärzotten lagern die Epithelzellen Glykogen ein, das nach dem Abschluß der Villogenese weiter nachweisbar ist (ALOISI 1932, ANDERSON und LEISSRING 1961); sein Abbau beginnt erst unmittelbar präpartal (MERRILL et al. 1967) und hält über die Ge-

burt hinaus an (HARTMANN und GOSSRAU 1978). Über den Syntheseweg und -ort und die beteiligten Enzyme können wir keine direkten Angaben machen, da bisher die entsprechenden biochemischen, histochemischen und elektronenmikroskopischen Befunde fehlen. Berücksichtigt man den allgemein üblichen Weg der Glykogensynthese, sollte daran wesentlich die Glykogensynthase (LOJDA et al. 1979, Lit.) beteiligt sein. Die zur Synthese u. a. notwendige Glucose könnte über das synchron mit der Glykogeneinlagerung sich differenzierende Mesenchym bzw. sich entwickelnde Kapillarsystem angeliefert werden. Diese Vorstellung kehrt die Situation im Herzen von Meerschweinchen und Ratte um, wo das Glykogen in dem Maße verschwindet wie die Kapillarisierung fortschreitet (TOTH und SCHIEBLER 1967). Postnatal kommen für den Glykogenverlust verschiedene Mechanismen in Frage, darunter der autophagische Glykogenabbau (HARTMANN und GOSSRAU 1978). Interessant ist, daß das glykogenhaltige Zottenepithel beim fetalen Meerschweinchen völlig dem im menschlichen Dünndarm, z. B. in der 12. Schwangerschaftswoche gleicht (LEV und WEISBERG 1969) und deshalb möglicherweise Übereinstimmungen zwischen der pränatalen Dünndarmentwicklung vom Meerschweinchen und Mensch bestehen. Wäre dies der Fall, würde sich das leichter zugängliche Meerschweinchenintestinum gut für Analogiestudien eignen.

Im Gegensatz zu den relativ guten generellen Vorstellungen über die Glykogensynthese und den Abbau des Glykogens läßt sich über die pränatale Glykogenfunktion nur spekulieren. Möglich wäre, daß es einschließlich des bei der Bildung der definitiven Sekundärzotten ins Dünndarmlumen gelangten Gly-

kogens eine schnell mobilisierbare Energiereserve darstellt, die im Bedarfsfall bzw. bei passageren lokalen oder generellen Mangelzuständen, z. B. wenn die Entwicklung der Gefäßversorgung nicht mehr Schritt mit der Epitheldifferenzierung hält und die Epithelzellen nur noch unzureichend versorgt werden, unter der Geburt oder pränatal an Stellen mit Glucosedefizit außerhalb des Darms in den Meerschweinchenembryonen oder -feten freigesetzt werden kann (NEEDHAM et al. 1937, O`CONNOR 1950, LINNEWEH und STAVE 1960, LINNEWEH 1965). Darüberhinaus könnten Beziehungen zwischen dem Glykogenabbau und der Synthese von Nucleinsäuren und damit dem Aufbau körpereigener Substanzen bestehen (SASSE 1968); vielleicht spielen das Glykogen oder seine Bruchstücke aber auch eine Rolle bei Glykoproteinsynthesen (PEYROT 1957) und der Bildung von "surface coats", die für viele fetale Epithelien typisch sind (LEV 1968), oder der definitiven Glykocalix. Ob der Tatsache funktionelle Bedeutung beizumessen ist, daß maximale Glykogenmenge und lysosomale Hydrolasenaktivitäten wenigstens im letzten Drittel der Pränatalentwicklung zeitlich zusammenfallen, müssen künftige Untersuchungen klären.

Außer der Villogenese und Glykogeneinlagerung differenzieren sich in der 2. Phase der Pränatalentwicklung Stroma und Epithel, wobei die Stromadifferenzierung der des Epithels möglicherweise etwas vorauseilt; durchschnittlich sieht man im Stroma eher Makrophagen, glatte Muskelzellen, Plasmocyten, Lymphocyten und Fibrocyten als endokrine Zellen und Becherzellen im Epithel. Eigentlich würde man eher den umgekehrten Fall erwarten, wenn berücksichtigt wird, daß z. B. Makro-

phagen mit hohen Aktivitäten an lysosomalen Hydrolasen erst wenige Tage vor der Geburt im Zottenstroma und vor allem danach zu beobachten sind und, wenigstens bei Ratten, intraepithelial einige proteasen- und phosphatasen-positive Lymphocyten erst zu finden sind, wenn die Tiere saugen, und zahlreiche, nachdem von Muttermilch auf Fremdnahrung umgestellt ist (GOSSRAU unveröff.). Vielleicht eilt hier die morphologische der mit histochemischen Methoden faßbaren enzymatischen Differenzierung voraus. Inwieweit sich die Differenzierungsvorgänge im Epithel und Stroma bzw. Mesenchym gegenseitig beeinflussen oder voneinander abhängen, ist ein Problem, über das unseres Wissens praktisch noch nichts bekannt ist.

In der 3. Phase der Pränatalentwicklung im Meerschweinchendünndarm stehen die Aktivitätsanstiege bei allen lysosomalen und z. T. auch der Hydrolasen im Vordergrund, die im Bürstensaum der Enterocyten spezifische Funktionen wahrnehmen können, z. B. der α-D-Glucosidasen und Dipeptidylaminopeptidase IV, während die Lactase geringe Umsatzraten aufweist; d. h. die mikrovillären Hydrolasen verhalten sich im Gegensatz zu den lysosomalen unterschiedlich. Besonders deutlich wird diese Diskrepanz, wenn die postnatalen Aktivitätsverläufe der Lactase und α-D-Glucosidasen mit berücksichtigt werden.

Die lysosomalen Hydrolasen haben bereits am Geburtstermin, d. h. unabhängig von der Zufuhr von Muttermilch und/oder Fremdnahrung weitgehend ihr Aktivitätsmaximum erreicht bzw. der Aktivitätsanstieg und die Ausbildung maximaler Umsätze

vollzieht sich ohne die Mitwirkung exogener Faktoren. Diese Hydrolasen und damit der Lysosomenapparat der Enterocyten sind zu einem Zeitpunkt maximal aktiv, an dem faßbare und funktionell plausible Substrate auf den ersten Blick fehlen. Lysosomen und saure Hydrolasen verarbeiten üblicherweise auch im Dünndarmepithel heterophagisch oder autophagisch die verschiedensten Makromoleküle, z. B. Glykoproteide oder Proteine (GOSSRAU 1975 b, Lit.), die im letzten Drittel der Pränatalzeit primär nicht in dem Ausmaß anfallen, daß sie die extrem hohen Aktivitäten der lysosomalen Hydrolasen erklären könnten. Ferner ist schwer vorstellbar, daß diese über mehr als 14 Tage hochaktiven Enterocytenenzyme letztlich allein postnatalen Aufgaben dienen (HARTMANN und GOSSRAU 1978) bzw. "auf Vorrat angelegt" sind. Wahrscheinlicher ist, daß beides zutrifft, d. h. die sauren Hydrolasen sind in den Enterocyten von Jejunum und Ileum prä- und postnatal tätig (vgl. WILLIAMS und BECK 1969, GOSSRAU 1975 b). Zumindest für die letzten 8 Pränataltage läßt sich zeigen, daß die Enterocyten Makromoleküle aus dem Darmlumen inkorporieren und in die Lysosomen einschleusen (WILLIAMS und BECK 1969). Solche Substanzen könnten beim Meerschweinchen auch aus dem Fruchtwasser stammen, das zur gleichen Zeit möglicherweise relativ reich an verschiedenen Makromolekülen sein kann (vgl. LEISSRING und ANDERSON 1961 b, WILD 1973, Lit., MORRIS 1974, Lit.); ferner könnte Zelldedritus, der im Rahmen der Untergänge der Zottenspitzen anfällt, nach Endocytose durch die Enterocyten und evtl. nach vorheriger luminaler Teilhydrolyse durch die freigesetzten Lysosomenenzyme und Kontaktverdauung (UGOLEV 1974, 1977) durch dann schon vorhandene [illegible] und an die Gly

kocalix adsorbierte Pankreasenzyme als Substrate für die lysosomalen Hydrolasen vitaler Saumzellen dienen; die anfallenden Hydrolyseprodukte bzw. Mono- und Dimere (JACQUES 1969, GORDON 1973, GOSSRAU 1975 b, Lit.) kämen sowohl für den Eigenbedarf der Enterocyten als auch zur Ernährung und für Wachstumsvorgänge des Gesamtorganismus der Meerschweinchenfeten in Frage. Die hohen Aktivitäten an lysosomalen Glycosidasen, Proteasen und Phosphatasen in den Enterocyten überall im Dünndarm machen es außerdem unwahrscheinlich, daß das Intestinum im Gegensatz zur Auffassung von ANDERSON und LEISSRING (1961) sowie LEISSRING und ANDERSON (1961 a, b) eine nennenswerte Rolle für die passive Immunisierung der Meerschweinchenfeten in der letzten Phase der Schwangerschaft spielt, denn es ist schwer vorstellbar, daß über das Fruchtwasser angelieferte materne Antikörper nach Aufnahme durch Endocytose in die Enterocyten nicht in deren Lysosomenapparat gelangen bzw. ihn vollständig oder wenigstens weitgehend unversehrt passieren und ins Blut abgegeben werden (vgl. WILLIAMS und BECK 1969, WILD 1973, MORRIS 1974). Aus der Sicht der postnatalen Bedarfslage wäre das schon pränatal voll entwickelte lysosomale Hydrolasensystem der Enterocyten sofort in der Lage, die dann anfallenden Muttermilchbestandteile optimal aufzuschließen und den Säuglingen zur Verfügung zu stellen (vgl. HARTMANN und GOSSRAU 1978).

Während bei allen Lysosomenhydrolasen und einigen Membranhydrolasen (alkalische Phosphatase, α-D-Glucosidasen und Peptidasen) sämtliche bzw. zahlreiche Befunde dafür sprechen, daß sie ihre Maximalaktivität vollständig oder weitgehend unabhängig von exogenen Faktoren entfalten, weisen speziell

unsere Meßergebnisse für die Lactase und (sofern es sich um ein eigenständiges Enzym handelt) die Cellobiase daraufhin, daß wir es hier möglicherweise mit einer Hydrolaseninduktion, z. B. durch Substanzen in der Nahrung zu tun haben; denn die Umsatzraten mit Methylumbelliferyl-ß-D-fucosid und -cellobiosid schnellen erst nach der Geburt und nach Aufnahme von Muttermilch in den Dünndarm in die Höhe; ferner hat sich bei Rattenfeten zeigen lassen, daß experimentell ins Fruchtwasser applizierte Lactose die Lactase vorzeitig aktiviert bzw. Lactose die Lactaseaktivität kurzfristig erhöht (LEV et al. 1979). Gleiche Effekte wären grundsätzlich für die Lactase im Bürstensaum des Meerschweinchenjejunum und -ileum durch die plötzlich in hoher Konzentration in der Muttermilch vorhandene Lactose (DE GROOT und HOOGENDORN 1957, HARTMANN und GOSSRAU 1978, Lit.) denkbar. Tatsache ist jedenfalls, daß die Bürstensaumhydrolasen der Dünndarmenterocyten während der Ontogenese nicht nur zu unterschiedlichen Zeiten auftreten, sondern auch differente Aktivitätsverläufe zeigen, möglicherweise verschieden reguliert werden und insgesamt absolute Differenzen aufweisen (vgl. MOOG 1971, YEH und MOOG 1974, GOSSRAU 1975 b, Lit.: Ratte, Maus). Die Lysosomenhydrolasen des pränatalen Dünndarmepithels verhalten sich dagegen eher uniform und fallen höchstens durch relative Unterschiede auf.

Vergleich der Entwicklung des Dunndarm- und Gallenblasenepithels

Vergleicht man die Entwicklung des Dünndarmepithels beim

Meerschweinchen mit der seines Gallenblasenepithels, das neben dem des Intestinums am gründlichsten untersucht worden ist (SCHIEBLER et al. 1975, WAHLIN und SCHIEBLER 1975), fallen Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf. Auch die pränatale Entwicklung des Gallenblasenepithels läuft schrittweise ab und läßt sich in 3 Phasen untergliedern, deren jeweils typische Ereignisse und zeitliche Gliederung mit der Situation im pränatalen Dünndarm gut übereinstimmen; beim Gallenblasen- und Dünndarmepithel dominiert in der 1. Phase die Proliferation (bis 30. ET bzw. bis 26. ET) gefolgt von der 2. Phase, in der die Cytodifferenzierung (und Glykogeneinlagerung) im Vordergrund steht (31.-45. ET bzw. 27.-50. ET); in der 3. Phase (ab 45. ET bzw. 51. ET) bereiten sich beide Epithelien auf ihre Funktion vor und sind am Geburtstermin weitgehend ausgereift. Den geringen zeitlichen Differenzen zwischen den Entwicklungsphasen von Gallenblasen- und Dünndarmepithel ist keine allzu große Bedeutung beizumessen; hierfür können methodische Unterschiede aber auch die Tatsache verantwortlich sein, daß die Entwicklung letztlich ein fließender Vorgang ist, und jede Phasengliederung etwas willkürlich vorgenommen bzw. voneinander abweichend unterteilt wird; vielleicht spielen zusätzlich organabhängige Differenzen eine Rolle.

Die Unterschiede zwischen der Entwicklung von Gallenblasen- und Dünndarmepithel liegen eher im Detail und dürften letztlich auf den verschiedenen prä- und postnatalen Aufgaben ihrer Organe beruhen, obwohl beide Epithelien resorbieren und sezernieren. Vor allem das Dünndarmepithel ist pränatal schon voll oder wenigstens partiell für den Gesamtorganismus tä-

tig; z. B. entstehen während der Cytodifferenzierung nur im Dünndarm Zotten- und Kryptenepithelien bzw. bilden sich Zotten und Krypten aus, und besitzt das Zottenepithel in seinem Bürstensaum Hydrolasen zur Spaltung von Disacchariden, Peptiden und Proteinen, die lediglich im Intestinum bereits vor der Geburt, besonders jedoch danach in großen Mengen vorkommen. Über Lysosomenhydrolasen verfügen die Epithelzellen beider Organe. Allerdings sind diese Enzyme in der Gallenblase sämtlich schwach aktiv; hochaktiv sind die lysosomalen Hydrolasen dagegen in den Epithelzellen des Dünndarms während der Entwicklung; denn allein hier dürften bereits pränatal beträchtliche Quantitäten an Makromolekülen anfallen, die endocytotisch aufgenommen und intraepithelial abgebaut bzw. verdaut werden müssen und dem uterinen Wachstum der Meerschweinchenfeten dienen könnten. All dies schließt nicht die Vorstellung ein, daß die genannten Strukturen sowie Membran- und Lysosomenhydrolasen im Dünndarm der Meerschweinchen durch exogene Faktoren, z. B. Zucker und Eiweiße im Fruchtwasser oder in der Muttermilch induziert werden, die in der Gallenblase fehlen. Vielmehr laufen nahezu sämtliche geschilderten morphologischen und enzymatischen Differenzierungsprozesse im Gallenblasen- und Dünndarmepithel beim Meerschweinchen in der Regel unabhängig davon ab; exogene Faktoren greifen höchstens modifizierend ein, indem z. B. der letzte Aktivitätsanstieg einiger Membranhydrolasen im Dünndarmepithel auch bei Meerschweinchen vermutlich nicht erfolgt, wenn die Muttermilch ausbleibt.

Die Hauptrolle für die im einzelnen doch unterschiedliche Differenzierung von Gallenblasen- und Dünndarmepithel beim

Meerschweinchen spielen sicherlich verschiedene endogene Mechanismen, wobei die dafür verantwortlichen molekularen Prozesse noch unbekannt sind.

Zusammengenommen wird deutlich, daß bei der Entwicklung des pränatalen Dünndarmepithels beim Meerschweinchen morphologische und enzymatische Vorgänge eng ineinandergreifen und sich die Entwicklung über mehrere Zwischenstufen bis zur Geburt erstreckt; dann ist der Dünndarm optimal auf seine postnatalen Aufgaben vorbereitet und erlaubt das ungestörte Wachstum der Meerschweinchensäuglinge; aber auch pränatal nimmt das Intestinum schon Aufgaben für den Gesamtorganismus wahr. Während die Lysosomenhydrolasen im Darmepithel morphogenetische, cytogenetische und nutritive Aufgaben wahrnehmen, stehen bei den membrangebundenen bzw. mikrovillären Hydrolasen die nutritiven im Vordergrund.

Offen gelassen hat unsere Untersuchung z. B. die sicher mannigfaltigen und für das Verständnis der Epithelentwicklung wesentlichen ultrastrukturellen Veränderungen und die Steuermechanismen, die für einen ungestörten Entwicklungsablauf und für die Auslösung und Abstimmung der zahlreichen verschiedenen Einzelschritte untereinander im Verlauf der Ontogenese des Darmepithels und seines Stromas sorgen.

Hier sind weitere, darunter experimentelle Studien nötig, für die unsere Untersuchung die Basis gelegt hat.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird mit histologischen, vor allem aber mit enzymhistochemischen und enzymbiochemischen Methoden die pränatale, und soweit nötig, auch die postnatale Differenzierung des Dünndarmepithels beim Meerschweinchen untersucht. Bei den nachgewiesenen Enzymen handelt es sich fast ausschließlich um Hydrolasen im Plasmalemm (alkalische Phosphatase, α-D-Glucosidasen, ß-D-Glycosidasen, Aminopeptidase M, Dipeptidylaminopeptidase IV, γ-Glutamyltransferase, unspezifische Esterasen) und Lysosomen (ß-D-N-Acetylglucosaminidase, ß-D-Glucuronidase, α-D-Mannosidase, α-D-Galactosidase, saure Phosphatase, saure ß-D-Galactosidase, Dipeptidylaminopeptidase II, unspezifische Esterasen; Membran- und Lysosomenhydrolasen). Zur biochemisch-fluorometrischen Messung der Membran- und Lysosomenhydrolasen sind Methylumbelliferylsubstrate wegen ihrer günstigeren kinetischen und meßtechnischen Eigenschaften von Methylumbelliferon den Naphthylsubstraten überlegen; mit allen Methylumbelliferylsubstraten sind die Michaeliskonstanten (K_m) kleiner und die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten (V_{max}) größer als mit den entsprechenden Naphthylsubstraten und äquimolares Methylumbelliferon fluoresziert intensiver als 1-Naphthol bzw. die Verfahren mit den Methylumbelliferylsubstraten sind empfindlicher.

Für die Lactase wird mit Methylumbelliferyl-ß-D-fucosid eine neue Methode mitgeteilt, die sich auch zur Messung dieser Glycosidase im Mikrobereich eignet. - Die differenten Befunde über das erste Auftreten der Membran- und Lysosomenhydro-

lasen im Dünndarmepithel beruhen bei den histochemischen Studien auf der unterschiedlichen Hydrolyserate der benutzten Indolyl-, 1-Naphthol-, Naphthol-AS- und Naphthylaminsubstrate, die Unterschiede zwischen den histochemischen und biochemischen Ergebnissen auf der Hemmung der Hydrolasen durch die Verwendung von Fixantien und Hilfsreagentien beim Enzymnachweis in situ.

Histologie, Histochemie und Biochemie zusammen zeigen, daß die pränatale Entwicklung an sich ein fließender Vorgang ist, prinzipiell aber in 3 Phasen untergliedert werden kann. In der 1. Phase (bis 26. Embryonaltag, ET; Proliferations- und Histogenesephase) proliferiert das Dünndarmepithel und wird mehrschichtig und bildet sich ohne nennenswerte Beteiligung von Hydrolasen die dreischichtige Darmwand aus; die schwach aktiven Lysosomenhydrolasen beschränken sich auf die basalen Epithellagen; von den Membranhydrolasen kommen die alkalische Phosphatase und Aminopeptidase M im luminalen Plasmalemm des mehrschichtigen Epithels vor. Am Ende dieser Phase kann zwischen Jejunum und Ileum unterschieden werden; methodenunabhängig eilt die Entwicklung des Jejunum der im Ileum um etwa 2 Tage voraus. In der 2. Phase (27.-50. ET, Cytodifferenzierungs-, Villogenesephase) entstehen durch Löcher und Spalten im Epithel, lumennahe (mit Hilfe lysosomaler Hydrolasen) untergehende Epithelzellen sowie durch einwachsendes Mesenchym Primärzotten mit mehrreihigem Epithel, die sich dann zu Sekundärzotten mit einschichtigem Epithel umwandeln; Plasmalemmata, die an Spalten und Löcher grenzen, besitzen alkalische Phosphatase und Aminopeptidase M. Parallel zur Entstehung von Sekundärzotten lagern die

Epithelzellen Glykogen ein, steigen in ihrem apikalen Cytoplasma die Aktivitäten der Lysosomenhydrolasen an und treten in der Mikrovillizone außer der alkalischen Phosphatase und Aminopeptidase M verschiedene Disaccharidasen und weitere Peptidasen auf. Die endgültigen Sekundärzotten bilden sich offenbar u. a. dadurch aus, daß erneut unter Beteiligung von Lysosomenhydrolasen das obere Zottendrittel zerfällt. Während der 3. Phase (51. ET bis Geburt; Vorbereitungsphase auf die postnatale Tätigkeit und Funktionsaufnahme) nehmen die Aktivitäten aller Lysosomenhydrolasen und die der meisten Membranhydrolasen massiv zu und differenzieren sich Zottenepithel und Zottenstroma.

Am Ende der Pränatalzeit ist das Dünndarmepithel praktisch voll funktionsfähig, so daß endogene Faktoren für seine Differenzierung maßgeblich sein dürften, eine Ausnahme machen die ß-D-Glycosidasen (unter ihnen die Lactase), die erst nach der Geburt durch Bestandteile der Muttermilch stark an Aktivität gewinnen und daher möglicherweise exogen induziert werden.

Verglichen miteinander nehmen die Lysosomenhydrolasen im pränatalen Dünndarmepithel vermutlich morphogenetische, cytogenetische und nutritive Aufgaben wahr, bei den Membranhydrolasen überwiegen die nutritiven.

LITERATUR

AHLERS, J., A. ARNOLD, Fr. R. von DÖHREN und H. W. PETER: Enzymkinetik. Stuttgart: Fischer 1974.

ALOISI, A.: Osservazioni sul gligogeno nell `embrione di cavia. Mon. Zool. Ital. 43, (1932) 173-179.

ANDERSON, J. W., and J. C. LEISSRING: The transfer of serum proteins from mother to young in the guinea pig. II. Histochemistry of tissues involved in prenatal transfer. Am. J. Anat. 109, (1961) 157-173.

BERGMEYER, H. U.: Grundlagen der enzymatischen Analyse. Weinheim New York: Chemie 1977.

BISSWANGER, H.: Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Weinheim New York: Chemie 1979.

BRETT, E. M., R. B. ELLIS, L. HAAS, U. J. IKONNE, D. B. LAKE, A. D. PATRICK und R. STEVENS (1973) zit. nach LEABECK (1975).

BURSTONE, M. S.: Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms. New York London: Academic Press 1962.

DE BAULT, L. E.: Gamma-glutamyl transpeptidase induction mediated by cell-to-cell contact in endothelial/glial cocultures. p. 24. Abstracts VIth International Histochemistry Cytochemistry Congress. Brighton/England 1980.

DE BOTH, N. J., and H. PLAISIER: The influence of changing cell kinetics on functional differentation in the small intestine of the rat. A study on enzymes involved in carbohydrate metabolism. J. Histochem. 22, (1974) 352-360.

DE GROOT, A. P., and P. HOOGENDORN: The detrimental effect of lactose. Quantitative lactase determinations in various

mammals. Neth. Milk Dairy J. 11, (1957) 290-303.

GEYER, G.: Ultrahistochemie. Stuttgart: Fischer 1973.

GORDON, A. H.: The role of lysosomes in protein catabolism. In: DINGLE, J. T. (ed.): Lysosomes in biology and pathology, Vol. III. Amsterdam London: North-Holland 1973, pp. 89-137.

GOSSRAU, R.: Enzyme histochemistry of the intestinal brush border. Acta Histochem. Cytochem. 8, (1975 a) 153-163.

GOSSRAU, R.: Die Lysosomen des Darmepithels. Eine entwicklungsgeschichtliche Untersuchung. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. 51, Heft 5 (1975 b).

GOSSRAU, R.: Fehlermöglichkeiten bei Enzymnachweisen mit Naphthylderivaten. Acta histochemica (Jena) Suppl. 14, (1975 c) 153-158.

GOSSRAU, R.: Localisation of glycosidases with naphthyl substrates. Histochemical J. 8, (1976 a) 271-282.

GOSSRAU, R.: Histochemische und biochemische Untersuchungen der α-Glucosidasen mit 2-Naphthyl-α-D-glucosid. Histochemistry 49, (1976 b) 193-211.

GOSSRAU, R.: Mikrochemische Unterschungen der α-D-Glucosidasen mit 4-Methylumbelliferyl- und 2-Naphthyl-α-D-glucosid. Histochemistry 52, (1977 a) 187-197.

GOSSRAU, R.: Über die Eignung von Naphthyl-α-L-fucosiden zur Untersuchung der α-L-Fucosidasen. Histochemistry 52, (1977 b) 219-237.

GOSSRAU, R.: Zur Eignung verschiedener Diazoniumsalze für histochemische Peptidasenuntersuchungen. Acta histochem. (Jena) Suppl. 21, (1980 a) 229-236.

GOSSRAU, R.: Investigation of proteinases in the digestive tract using 4-methoxy-2-naphthylamine (MNA) substrates.

J. Histochem. Cytochem. (1980 b, im Druck).

GOSSRAU, R., and Z. LOJDA: Study on dipeptidylpeptidase II (DPP II). Histochemistry 70, (1980, im Druck).

HARTMANN, K. und R. GOSSRAU: Die postnatale Entwicklung des Dünndarmepithels beim Meerschweinchen. Progr. Histochem. Cytochem. 11, Heft 2 (1978).

HAVRÁNKOVÁ, E., and Z. LOJDA: Development of the brush border enzymes of the guinea-pig and rat enterocytes. Acta Univ. Carol. Med. 79, (1977) 125-130.

HIRŠOVÁ, D., J. KRAML, J. KOLÍNSKÁ, Z. LOJDA, and J. SLABÝ: Substrate specifity of intestinal glycosidases. Acta Univ. Carol. Med. 77, (1977) 95-104.

JACQUES, P. J.: Endocytosis. In: DINGLE, J. D., and H. B. FELL (eds.): Lysosomes in biology and pathology, Vol. II. Amsterdam London: North-Holland 1969, pp. 395-420.

JUNG, S.: Grundlagen für die Zucht und Haltung der wichtigsten Versuchstiere. Stuttgart: Fischer 1962.

KAUFMANN, P.: Die Meerschweinchenplacenta und ihre Entwicklung. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 129, (1969) 83-101.

KAUFMANN, P., and M. DAVIDOFF: The guinea-pig placenta. Adv. Anat. 53, Heft 2 (1977).

KENNY, A. J.: Proteinases associated with cell membranes. In: BARRETT, A. J. (ed.): Proteinases in mammalian cells and tissues. Amsterdam New York Oxford: North-Holland 1977, pp. 393-444.

KOLDOVSKÝ, O.: Development of the functions of the small intestine in mammals and man. Basel New York: Karger 1969.

KOLDOVSKÝ, O., A. HERINGOVÁ, V. JIRSOVÁ, F. CHYTIL, and J. HOSKOVÁ: Postnatal changes in ß-galactosidase activity in the jejunum and ileum of mice, rabbits, and guinea-

pigs. Canadian. J. Biochem. 44, (1966) 523-527.

KRAML, J., and Z. LOJDA: Biochemistry and immunochemistry of membrane-bound enzymes. Acta Univ. Carol. Med. 77, (1977) 83-94.

LEABECK, D. H.: An introduction to the fluorometric estimation of enzyme activities, 2nd ed. Colnbrook: Koch-Light Laboraties Ltd. 1975.

LEISSRING, J. C., and J. W. ANDERSON: The transfer of serum proteins from mother to young in the guinea-pig. I. Prenatal rates and routes. Am. J. Anat. 109, (1961 a) 149-155.

LEISSRING, J, C., and J. W. ANDERSON: The transfer of serum proteins from mother to young in the guinea-pig. III. Postnatal rates and routes. Am. J. Anat. 109, (1961 b) 175-179.

LEV, R.: A histochemical study of glycogen and mucin in developing human foetal epithelia. Histochem. J. 1, (1968) 152-165.

LEV, R., M. S. BENDER, and H. D. APPLETON: The biochemical and histochemical demonstration of lactase induction in fetal rat intestine by intraamniotic injection of lactose. Histochemistry 61, (1979) 255-262.

LEV, R., and H. WEISBERG: Human foetal epithelial glycogen: A histochemical and electron microscopic study. J. Anat. (Lond.) 105, (1969) 337-349.

LINEWEAVER, H., and D. BURK: The determination of enzyme dissociation constants. Am. J. chem. Soc. 56, (1934) 658-666.

LINNEWEH, F.: Postnatale Adaptation. In: LINNEWEH, F. (Hrsg.): Fortschritte der Pädologie, Bd. 1. Berlin Heidelberg New

York: Springer 1965 S. 1-10.

LINNEWEH, F. und U. STAVE: Über die Anpassungsvorgänge nach der Geburt. Klin. Wschr. 38, (1960) 1-5.

LOJDA, Z.: Indigogenic methods for glycosidases. II. An improved method for ß-D-galactosidase and its application to localisation studies of the enzymes in the intestine and other tissues. Histochemie 23, (1970) 266-288.

LOJDA, Z.: The histochemical demonstration of brush border endopeptidase. Histochemistry 64, (1979) 205-211.

LOJDA, Z., and R. GOSSRAU: Study on aminopeptidase A. Histochemistry 67, (1980) 267-290.

LOJDA, Z., R. GOSSRAU und T. H. SCHIEBLER: Enzymhistochemische Methoden. Berlin Heidelberg New York: Springer 1976.

LOJDA, Z., R. GOSSRAU, and T. H. SCHIEBLER: Enzyme histochemistry. A laboratory manual. Berlin Heidelberg New York: Springer 1979.

LOJDA, Z., J. SLABÝ, J. KRAML, and J. KOLÍNSKÁ: Synthetic substrates in the histochemical demonstration of intestinal disaccharidases. Histochemie 34, (1973) 361-369.

MATHAN, M., P. C. MOXEY, and J. S. TRIER: Morphogenesis of fetal rat duodenal villi. Am. J. Anat. 146, (1975) 73-92.

MCDONALD, J. K., and C. SCHWABE: Intracellular exopeptidases. In: BARRETT, A. J. (ed.): Proteinases in mammalian cells and tissues. Amsterdam New York Oxford: North-Holland 1977, pp. 311-391.

MERRILL, T. G., H. SPRINZ, and A. J. TOUSIMIS: Changes of the intestinal absorptive cells during maturation: An electron microscopic study of prenatal and adult guinea-

pig ileum. J. Ultrastruct. Res. 19, (1967) 304-326.

MOOG, F.: Corticoids and enzyme maturation of the intestinal surface: alkaline phosphatase, leucyl aminopeptidase, and sucrase. In: HAMBURGH, M., and E. J. W. BARINGTON (eds.): Hormones in development, New York: Meredith 1971, pp. 143-160.

MORRIS, I. G.: Immunological proteins. In: SMYTH, D. H. (ed.): Biomembranes, Vol. 4 A. Intestinal absorption, London New York: Plenum 1974, pp. 483-540.

NEEDHAM, J., W. W. NOWINSKI, K. C. DIXON, R. P. COOK, and H. LEHMANN: Intermediary carbohydrate metabolism in embryonic life. I. General aspects of anaerobic glycolysis. II. The formation and removal of pyruvic acid. III. The Pasteur effect and the Meyerhof cycle. IV. The distribution of acid soluble phosphorus. V. The phosphorylation cycles. VI. Glycolysis without phosphorylation. VII. Experiments on the nature of non-phosphorylation glycolysis. Biochem. J. 31, (1937) 1165-1254.

NOVIKOFF, A., and E. HOLTZMANN: Cells and cell organelles. 2nd ed. New York Chicago San Fransisco Atlanta Dallas Montreal Toronto London Sidney: Holt Rinehart and Winston 1976.

O'CONNOR, R. J.: The effect on cell division of inhibiting aerobic glycolysis. Brit. J. exp. Path. 31, (1950) 449-453.

PATZELT, V.: Der Darm. In: MOLLENDORF, W. v. (Hrsg.): Hdb. der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 5/III Berlin: Springer 1936.

PEYROT, A.: Osservazioni nel compartemento del glicogeno nella morfogenesi della mucosa duodenale nel topo, nella

cavia e nel pulario. Contributo alla biologia della nascita. Monitore zool. ital. 64, (1957) 107-120.

PEXIEDER, T.: Cell death in the morphogenesis and teratogenesis of the heart. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. 51, Heft 3 (1975).

PRENNA, G., G. BOTTIROLI, and G. MAZZINI: Cytofluorometric quantification of the activity and reaction kinetics of acid phosphatase. Histochem. J. 9, (1977) 15-30.

ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. München: Oldenbourg 1968.

ROMMEL, K. und R. BÖHMER: Messung der Disaccharidasen der Dünndarmschleimhaut. In: ENGELHARDT, A. und H. LOMMEL (Hrsg.): Malabsorption und Maldigestion, Bd. II, Weinheim: Chemie 1974, S. 137-141.

SASSE, D.: Glykogen in der Ontogenese des Verdauungstraktes. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. 40, Heft 2 (1968).

SCHIEBLER, T. H., K. LANG und T. WAHLIN: Zur Entwicklung des Gallenblasenepithels des Meerschweinchens. Färberisch-lichtmikroskopische und kohlenhydrat-histochemische Untersuchungen. Histochemistry 45, (1975) 177-190.

SCHLÜTER, G.: Ultrastructural observations on cell necrosis during formation of the neural tube in mouse embryos. Z. Anat. Entwickl.-Gesch. 141, (1973) 251-264.

SCHOFFELD, B. H., M. A. GEFFERT, R. A. COLEMAN, and D. F. MCDONALD: Histochemical localisation of lysosomal and non-lysosomal phosphodiesterases. J. Histochem. Cytochem. 27, (1979) 711.

SEMENZA, G.: Intestinal oligosaccharidases and disaccharidases. In: CODE, C. F. (ed.): Handbook of physiology. Alimentary canal, Vol. III. Am. Physiol. Society, Washington 1968, pp. 2542-2566.

SEMENZA, G.: Intestinal membrane-bound carbohydrases. Acta Univ. Carol. Med. 77, 21-30.

SLABÝ, J., Z. LOJDA, J. KRAML, and J. KOLÍNSKÁ: Immunohistochemical localisation of intestinal glycosidases. Acta Univ. Carol. Med. 77, (1977) 105-111.

SPANNHOF, F.: Einführung in die Praxis der Histochemie. Jena: VEB Fischer 1967.

STRAUSS, E. und R. GOSSRAU: Histochemische und biochemische Untersuchungen von Hydrolasen im Meerschweinchendünndarm während der Entwicklung. Anat. Anz. 147, (1980) 496.

TOTH, A. und T. H. SCHIEBLER: Über die Entwicklung der Arbeits- und Erregungsleitungsmuskulatur des Herzens von Ratte und Meerschweinchen. Histologische, histochemische und elektrophysiologische Untersuchungen. Z. Zellforsch. 76, (1967) 543-567.

UNDENFRIEND, S.: Fluorescence assay in biology and medicine, Vol. I. New York London: Academic Press 1962.

UNDENFRIEND, S.: Fluorescence assay in biology and medicine, Vol. II. New York London: Academic Press 1969.

UGOLEV, A. M.: Membrane (contact) digestion. In: SMYTH, D. H. (ed.): Biomembranes, Vol. 4 A, London New York: Plenum 1974, pp. 285-362.

UGOLEV, A. M., P. DE LAEY, and N. N. IEZUITOVA: Absorption of enzymes by cell membrane structures (on example of enterocytes) under normal and pathological conditions. Acta Univ. Carol. Med. 77, (1977) 5-19.

VOLLRATH, L.: Über die Entwicklung des Dünndarms der Ratte. Morphologische, histochemische und experimentelle Untersuchungen. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. 41, Heft 2 (1969).

WAHLIN, T. und T. H. SCHIEBLER: Zur Entwicklung des Gallenblasenepithels des Meerschweinchens. Elektronenmikroskopische und enzymhistochemische Untersuchungen. Histochemistry 44, (1975) 253-275.

WILD, A. E.: Transport of immunoglobulins and other proteins from mother to young. In: DINGLE, J. T. (ed.): Lysosomes in biology and pathology, Vol. III, Amsterdam London: North-Holland 1973, pp. 169-215.

WILLIAMS, R. M., and F. BECK: A histochemical study of gut maturation. J. Anat. (Lond.) 105, (1969) 487-501.

YEH, K., and F. MOOG: Intestinal lactase activity in the suckling rat: Influence of hypophysectomy and thyreodectomy. Science 183, (1974) 77-79.

Tab. 1 Kinetische Untersuchungen der mikrovillären Hydrolasen mit Methylumbelliferylsubstraten

	pH-Optimum	Substratoptimum (mM)	K_m (mM)	V_{max} (F)	Inkubationszeit (min)
Methylumbelliferylphosphat	9,5	0,375	0,18	147,2	5
Methylumbelliferyl-α-D-glucosid	6,5	0,375	0,07	131,3	20
Methylumbelliferyl-ß-D-glucosid	6,0	0,375	0,10	126,0	20
Methylumbelliferyl-ß-D-cellobiosid	6,0	1,5	0,17	94,0	20
Methylumbelliferyl-ß-D-fucosid	6,0	0,375	0,09	166,9	20
Methylumbelliferyl-ß-D-galactosid	6,0	0,75	0,15	129,8	20

Tab. 2 Kinetische Untersuchungen der lysosomalen Hydrolasen mit Methylumbelliferyl- und 1-Naphthylsubstraten

	pH-Optimum	Substratoptimum (mM)	K_m (mM)	V_{max} (F)	Inkubationszeit (min)
Methylumbelliferyl-ß-D-N-acetyl-glucosaminid	5,0	0,375	0,09	174,3	5
Methylumbelliferyl-α-D-mannosid	4,0	1,5	0,22	125,8	20
Methylumbelliferyl-α-D-galactosid	5,0	6,0	0,91	63,2	20
Methylumbelliferyl-ß-D-glucuronid	4,5	0,375	0,12	205,8	20
Methylumbelliferyl-ß-D-galactosid	4,0	0,75	0,31	127,0	20
Methylumbelliferylphosphat	5,5	0,375	0,12	192,5	5
1-Naphthyl-ß-D-N-acetylglucosaminid	5,0	1,5	2,5		
1-Naphthyl-α-D-mannosid	4,0	6,0	0,9		
1-Naphthyl-α-D-galactosid	5,0	3,0	10,0		
1-Naphthyl-ß-D-glucuronid	4,5	3,0	0,25		
1-Naphthyl-ß-D-galactosid	4,0	3,0	0,34		
1-Naphthylphosphat	5,5	12,0	2,2		

Legenden

Abb. 1. 22. ET, mehrschichtiges oder mehrreihiges Epithel mit basalen (Doppelpfeile) und diffus verstreuten Granula (Pfeile). L = Lumen, M = Mesenchym. Objektiv 40 x.

Abb. 2. 35. ET, Jejunum. Quergetroffene Sekundärzotten mit einschichtigem Epithel. S = Stroma, K = Kapillaren. Objektiv 40 x.

Abb. 3. 49. ET, Ileum. Untergehende Zottenreste im Darmlumen. Pfeile = Lysosomen. Objektiv 25 x.

Abb. 4. 53. ET, Jejunum. Enterocyten mit hellen, großen Lysosomen (Pfeile). S = Stroma, L = Lumen. Objektiv 25 x.

Abb. 5.-8. Alkalische Phosphatase, Nachweis mit Naphthol-AS-TR-phosphat und Fast Blue B.

Abb. 5. 22. ET, Reaktionsprodukt im lumennahen Plasmalemm. Objektiv 40 x.

Abb. 6. 28. ET, Jejunum. Farbstoff im lumennahen Plasmalemm (Doppelpfeile), Spalten (Pfeile) und intraepithelialen Löchern (Pfeilköpfe). Objektiv 10 x.

Abb. 7. 35. ET, Ileum. Reaktion im Bürstensaum (Pfeile) und Stroma (S). Objektiv 25 x.

Abb. 8. 42. ET, Jejunum. Farbstoff im Bürstensaum (Doppelpfeile) und in neutrophilen Granulozyten (Pfeile) des Jejunums. Objektiv 25 x.

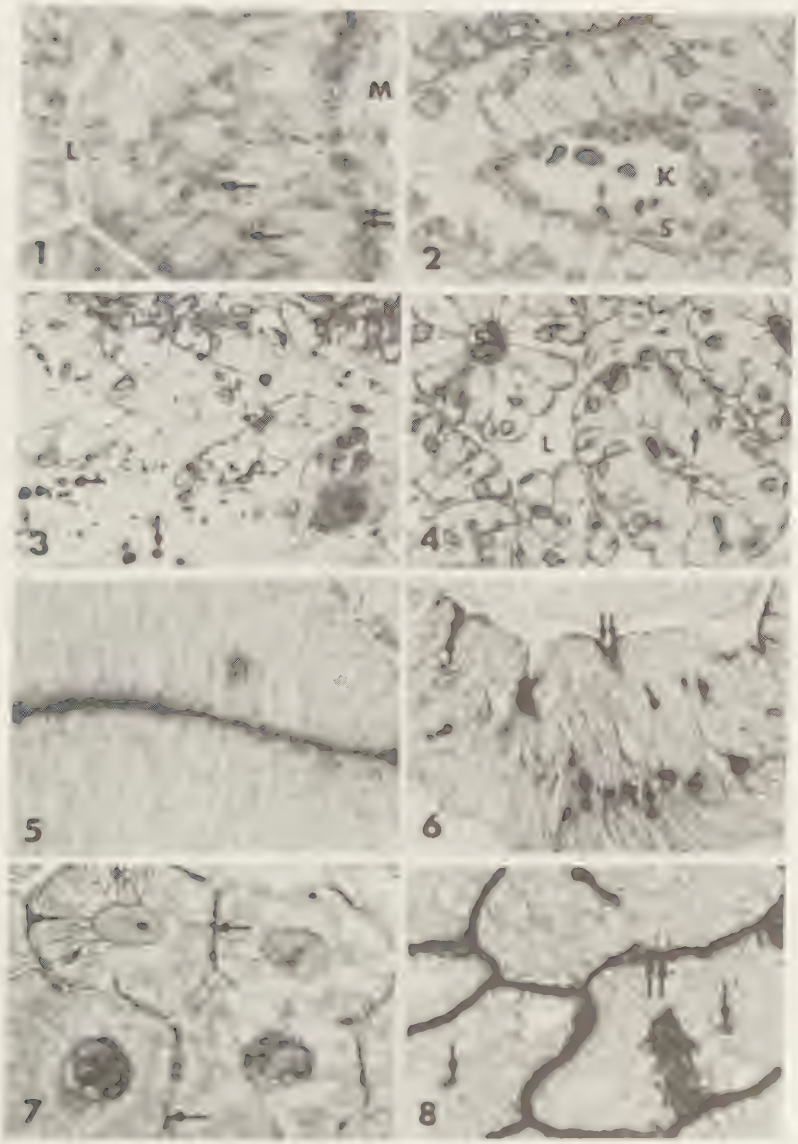

M
L
1
K
S
2
3
L
4
5
6
7
8

Abb. 9. 60. ET, Jejunum. Lactase-Nachweis mit Indigogen-verfahren und 5-Br-4-Cl-3-Indoxyl-ß-D-fucosid. Reaktion im Bürstensaum. Objektiv 25 x.

Abb. 10. 41. ET, Ileum. α-D-Glucosidasen in Bürstensaum (Pfeile) und Lumen (L). Objektiv 25 x.

Abb. 11.-15. ß-D-N-Acetylglucosaminidase.

Abb. 11. 28. ET, Jejunum. Reaktionsprodukt in Lysosomen (Pfeile) von Epithelzellen oberhalb der Basalmembran. M = Mesenchym. Objektiv 25 x.

Abb. 12. 29. ET, Ileum. Farbstoff in Lysosomen (Pfeile) lumennaher Epithelzellen. Objektiv 25 x.

Abb. 13. 40. ET, Jejunum. Reaktion im basalen (Peile) und apikalen (Doppelpfeile) Cytoplasma der Epithelzellen. Objektiv 25 x.

Abb. 14. 48. ET, Jejunum. Verglichen mit dem 40. ET mehr Farbstoff im apikalen Cytoplasma der Epithelzellen. Objektiv 25 x.

Abb. 15. 61. ET, Ileum. Reaktion in Enterocyten und Stromazellen (Pfeil). Objektiv 25 x.

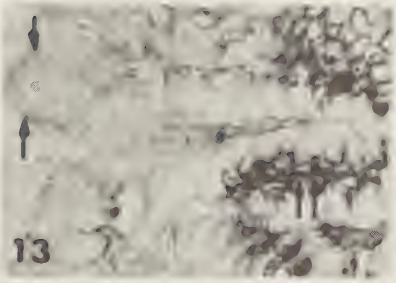
Abb. 16. 53. ET, Jejunum. ß-D-Glucuronidase. Reaktionsausfall s. Abb. 15. Objektiv 25 x.

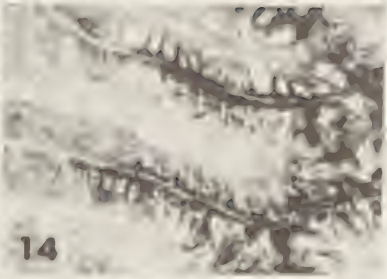
9

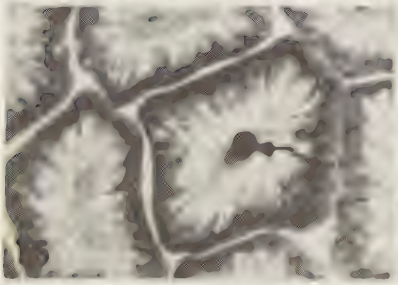
10

11
M

12


13


14


15

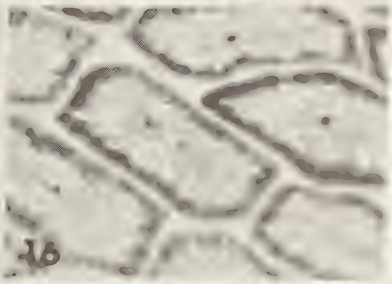

16

Abb. 17.-18. α-D-Mannosidase.

Abb. 17. 51. ET, Ileum. Reaktionsprodukt im apikalen Enterocytencytoplasma des oberen und mittleren Zottendrittels. Objektiv 25 x.

Abb. 18. 63. ET, Jejunum. Verglichen mit dem 51. ET hat die Farbstoffmenge im apikalen Cytoplasma der Enterocyten zugenommen. Objektiv 25 x.

Abb. 19.-21. Unspezifische Esterasen, Nachweis mit 1-Naphthylacetat.

Abb. 19. 26. ET, Jejunum. Reaktionsprodukt oberhalb der Basalmembran (Pfeile) M = Mesenchym. Objektiv 40 x.

Abb. 20. 35. ET, Jejunum. Farbstoff im lumennahen und lateralen Plasmalemm sowie im apikalen Cytoplasma und in den Kernen (Pfeile) der Enterocyten. S = Stroma. Objektiv 25 x.

Abb. 21. 56. ET, Ileum. Reaktionsprodukt in Lysosomen (Pfeile), frei im Darmlumen (Doppelpfeile) und in intakten Enterocyten (iE). Objektiv 10 x.

Abb. 22.-24. ß-D-N-Acetylglucosaminidase.

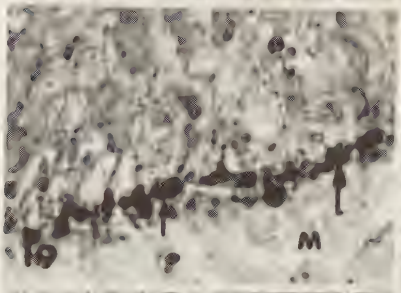
Abb. 22. 47. ET, Jejunum. Reaktionsprodukt in großen Granula (Pfeile) der Enterocyten des oberen Zottendrittels, S = Stroma. Objektiv 10 x.

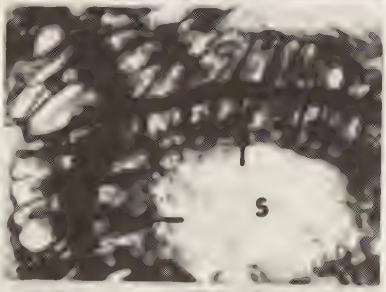
Abb. 23. 50. ET, Ileum. Zerfallende Enterocyten (zE) im Darmlumen, iE = noch weitgehend intakte Enterocyten. Objektiv 25 x.

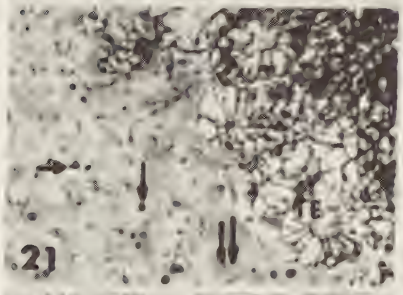
Abb. 24. 56. ET, Jejunum. Farbstoff in intakten (iE) und schon zerfallenden Enterocyten (zE). Objektiv 25 x.

17

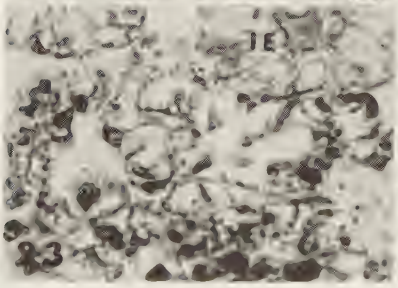
18


19
M


S


21
IE

22
S
S


23
IE

24
IE

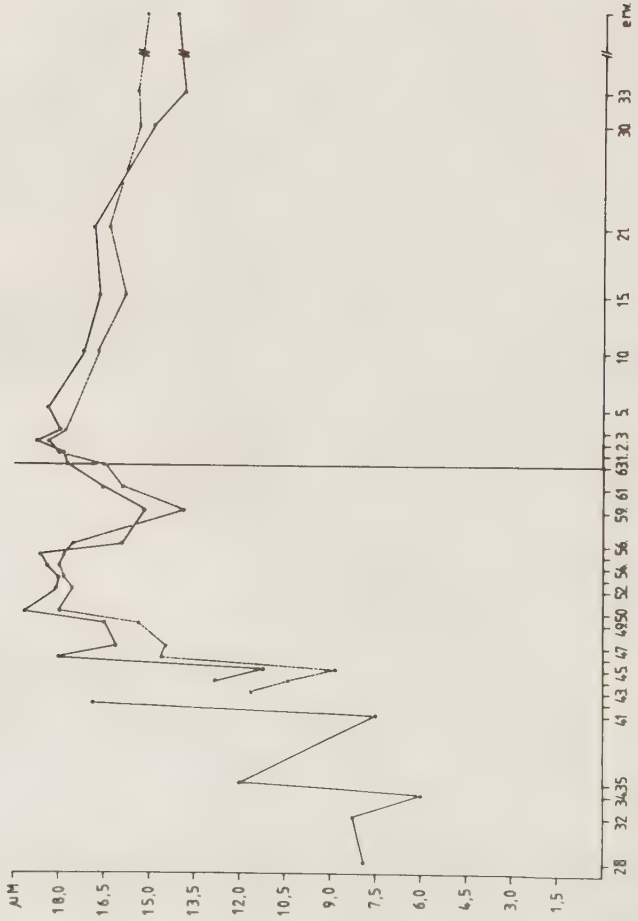


Abb. 25. Alkalische Phosphatase, prä- und postnataler Aktivitätsverlauf mit Methylumbelliferylphosphat, Aktivitätsangaben in µ Molen (µM) umgesetztes Substrat. ● —— ● —— ● gesamter Dünndarm, ● —— ● —— ● Jejunum, ✕---- ✕---- ✕ Ileum.

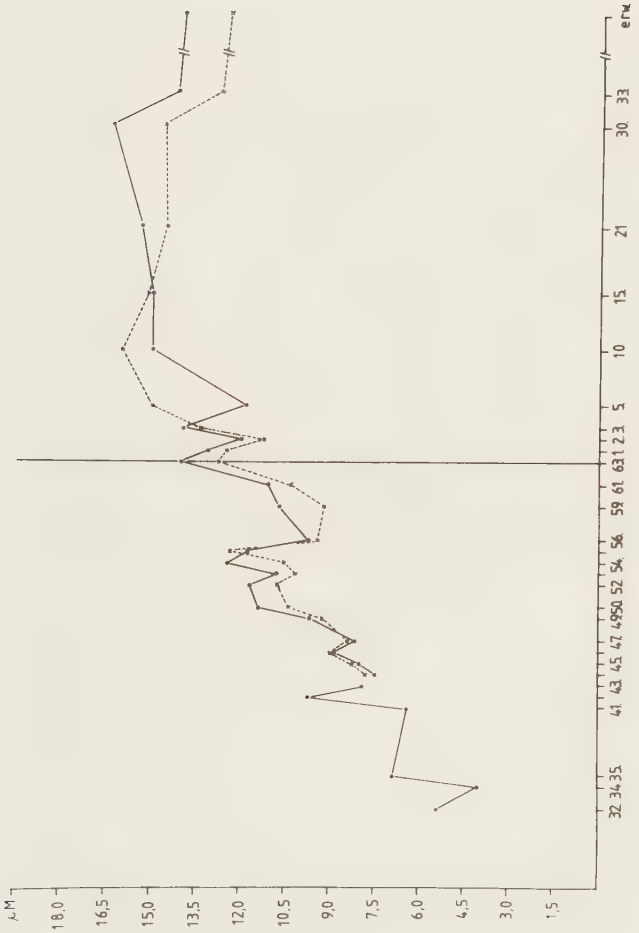


Abb. 26. α-D-Glucosidasen. Umsatz mit Methylumbelliferyl-α-D-glucosid, sonst s. Abb. 25.

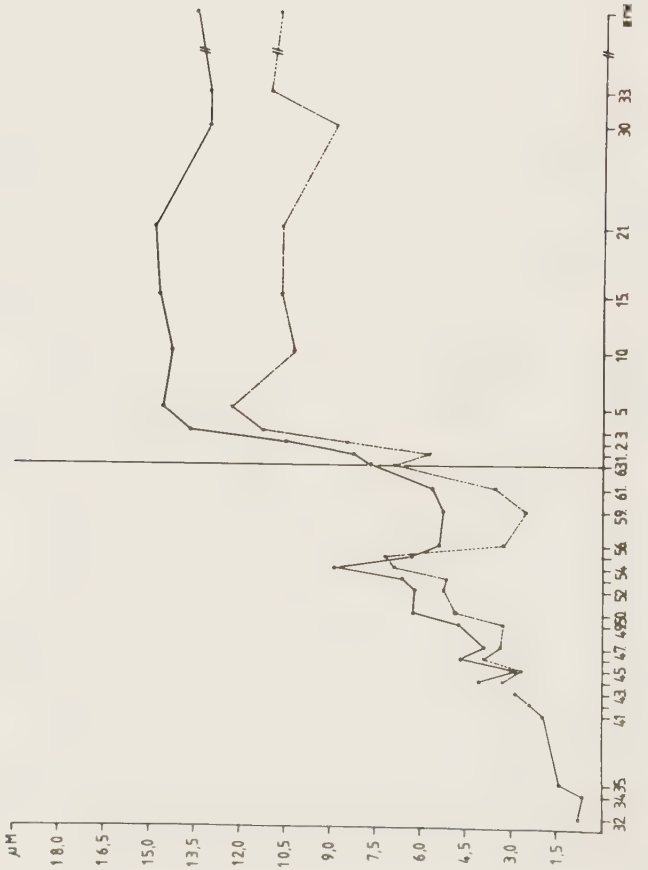


Abb. 27. ß-D-Glycosidasen. Umsatz mit Methylumbelliferyl-ß-D-glucosid, sonst s. Abb. 25.

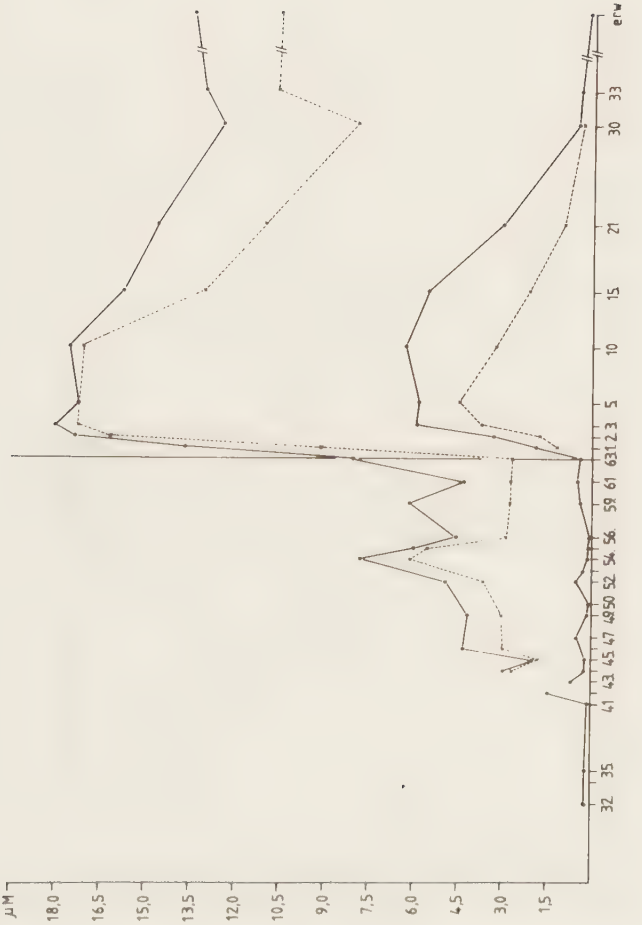


Abb. 28. ß-D-Glycosidasen. Umsatz mit Methylumbelliferyl-ß-D-fucosid (obere 2 Kurven) und Methylumbelliferyl-ß-D-cellobiosid (untere 2 Kurven), sonst s. Abb. 25.

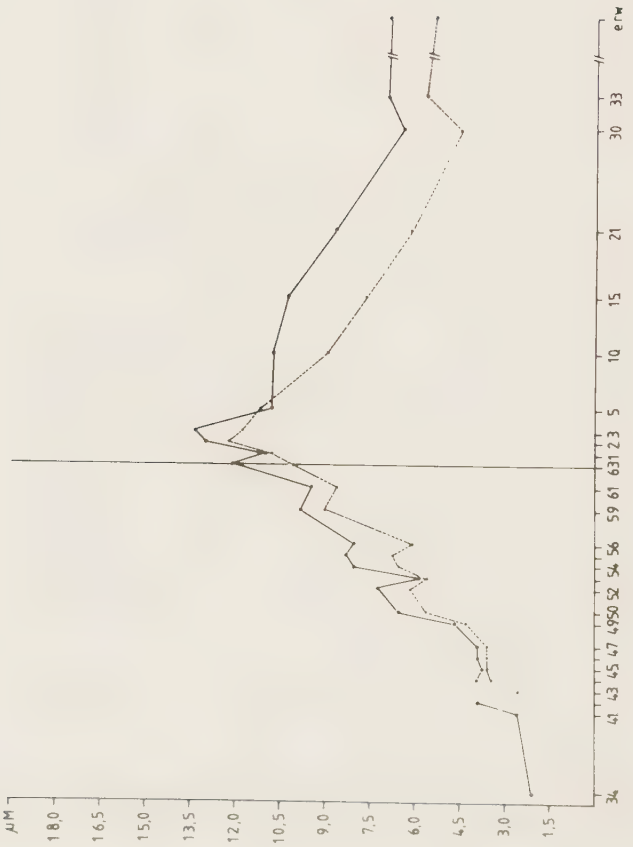


Abb. 29. ß-D-Galactosidase. Umsatz mit Methylumbelliferyl-ß-D-galactosid, sonst s. Abb. 25.

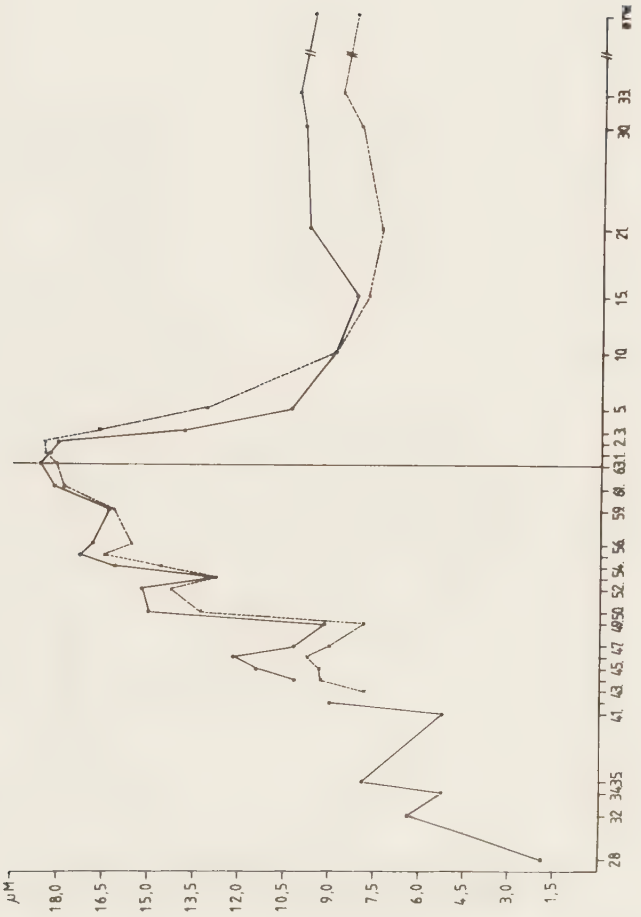


Abb. 30. ß-D-N-Acetylglucosaminidase. Umsatz mit Methylumbelliferyl-ß-D-N-acetylglucosaminid, sonst s. Abb. 25.

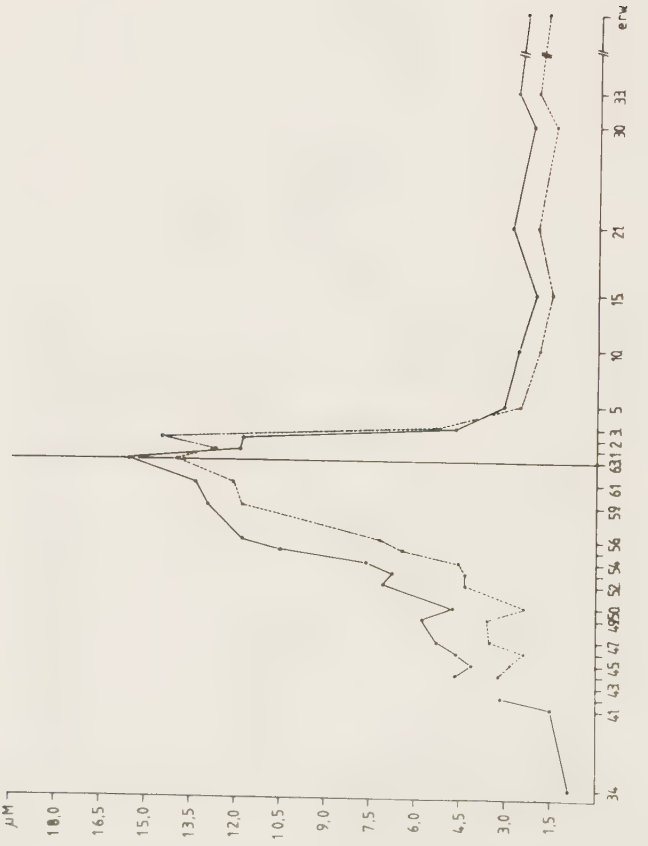


Abb. 31. α-D-Mannosidase. Umsatz mit Methylumbelliferyl-α-D-mannosid, sonst s. Abb. 25.

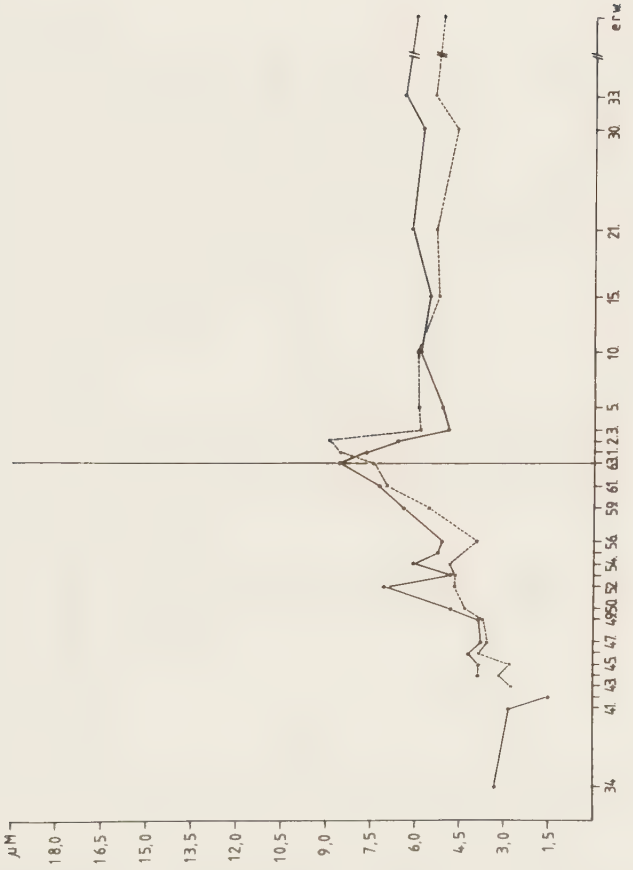


Abb. 32. α-D-Galactosidase. Umsatz mit Methylumbelliferyl-α-D-galactosid, sonst s. Abb. 25.

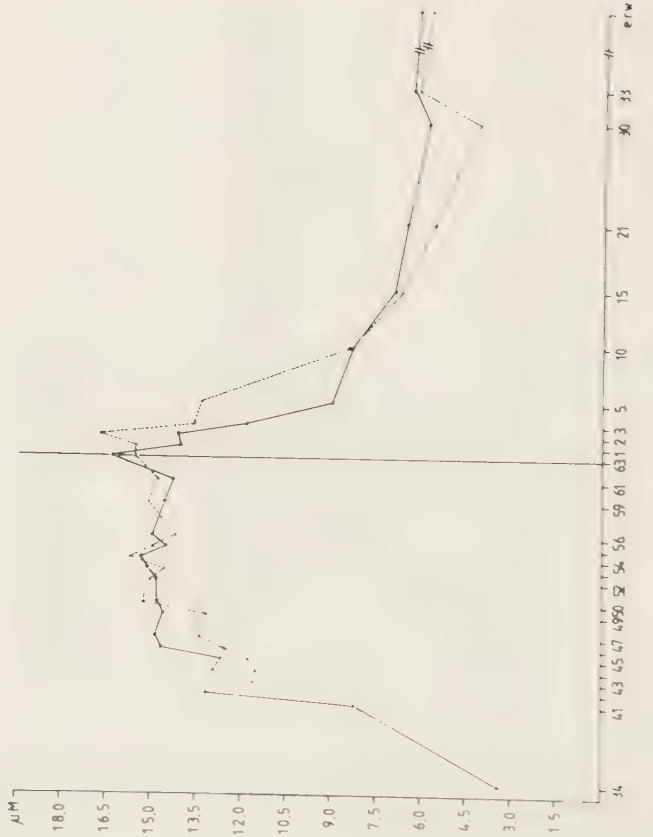


Abb. 33. ß-D-Glucuronidase. Umsatz mit Methylumbelliferyl-ß-D-glucuronid, sonst s. Abb. 25.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. R. Gossrau für die Überlassung des Themas, vor allem aber dafür recht herzlich danken, daß er mich gründlich in den Gegenstand dieser Arbeit eingeführt und mich immer verständnisvoll und unermüdlich während der Durchführung der Arbeit unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. med. T. H. Schiebler danke ich herzlich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes und die Übernahme des Korreferates.

L e b e n s l a u f

Am 12. Mai 1951 wurde ich, Ernst Friedrich Strauß, als 1. Kind der Eheleute Peter und Erna Strauß, geb. Dasch in Windsheim/Mfr. geboren.

1957 trat ich in die Volksschule in Windsheim ein, wechselte im September 1962 auf das Georg-Wilhelm-Steller-Gymnasium über und legte dort im Juni 1971 das Abitur ab. Anschließend leistete ich bis April 1972 freiwilligen Krankenpflegedienst an der Stiftsklinik Augustinum in Bad Windsheim.

Vom SS 1972 bis zum WS 1973/74 studierte ich Physik an der Universität Würzburg. Im SS 1974 begann ich hier mit dem Studium der Humanmedizin. Im August 1976 legte ich die Ärztliche Vorprüfung, im August 1977 den 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, im August 1979 den 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und im Oktober 1980 den 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Am 29. Oktober 1980 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Im Mai 1979 heiratete ich die med.-techn. Assistentin Helga Strauß, geb. Groß; im Mai 1980 wurde unser Sohn Peter geboren.

Ernst Strauß

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80